

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-141870

(43)公開日 平成 6年(1994) 5月24日

(51)Int.Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
C 1 2 N 15/51 Z N A
5/10
15/86

9281-4B

C 1 2 N 5/ 00

B

8931-4B

15/ 00

A

審査請求 未請求 請求項の数15(全 22 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-88140

(22)出願日 平成 4年(1992) 3月12日

(71)出願人 591063394

財団法人東京都臨床医学総合研究所
東京都文京区本駒込 3 丁目18番22号

(71)出願人 000144577

株式会社三和化学研究所
愛知県名古屋市東区東外堀町35番地

(71)出願人 390022998

東燃株式会社
東京都千代田区一ツ橋 1 丁目 1 番 1 号

(72)発明者 野本 明男

東京都文京区本駒込三丁目18番22号 財団
法人 東京都臨床医学総合研究所内

(74)代理人 弁理士 久保田 耕平 (外 4 名)

最終頁に続く

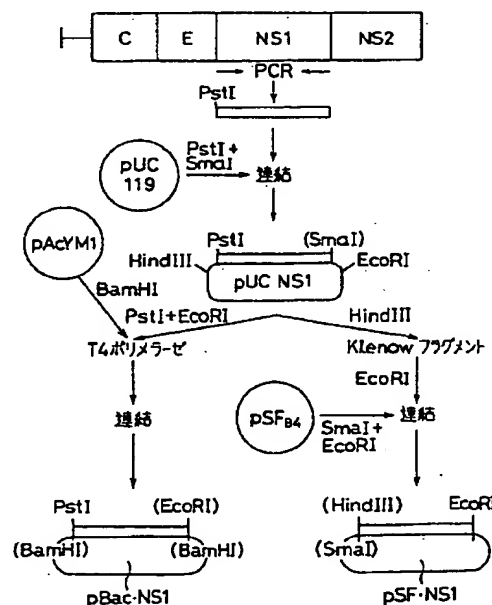
(54)【発明の名称】 非A非B型肝炎ウイルス抗原をコードするDNA断片

(57)【要約】 (修正有)

【目的】非A非B型肝炎ウイルス抗原をコードするDNA断片及びその利用方法の提供。

【構成】非A非B型肝炎ウイルス抗原、特にコア、エンペロープ (ENV/NS1)、NS2抗原をコードするDNA断片、該DNA断片の発現系、並びに該発現系の発現による組換え (ポリ) ペプチドの製造方法。

図 4



【特許請求の範囲】

【請求項1】 非A非B型肝炎ウイルス抗原の配列番号2によって示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列を含むDNA断片。

【請求項2】 配列番号2によって示される全ヌクレオチドから成るDNA断片。

【請求項3】 配列番号2によって示されるアミノ酸番号192から383までの非A非B型肝炎ウイルスENV抗原の全部又は一部をコードするDNA断片。

【請求項4】 配列番号2によって示されるアミノ酸番号384から810までの非A非B型肝炎ウイルスNS1抗原の全部又は一部をコードするDNA断片。

【請求項5】 配列番号2によって示されるアミノ酸番号811から1051までの非A非B型肝炎ウイルスNS2抗原の全部又は一部をコードするDNA断片。

【請求項6】 非A非B型肝炎ウイルス抗原の配列番号3によって示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列を含むDNA断片。

【請求項7】 配列番号3によって示される全ヌクレオチドから成るDNA断片。

【請求項8】 配列番号3によって示されるアミノ酸番号192から383までの非A非B型肝炎ウイルスENV抗原の全部又は一部をコードするDNA断片。

【請求項9】 配列番号3によって示されるアミノ酸番号384から810までの非A非B型肝炎ウイルスNS1抗原の全部又は一部をコードするDNA断片。

【請求項10】 配列番号3によって示されるアミノ酸番号811から1031までの非A非B型肝炎ウイルスNS2抗原の全部又は一部をコードするDNA断片。

【請求項11】 請求項1～10のいずれか一項に記載のDNA断片をプロモーターの下流に存在するベクター内のクローニング部位に導入して得られる発現ベクター。

【請求項12】 前記ベクターがウイルスである請求項11記載の発現ベクター。

【請求項13】 宿主に、請求項11又は12に記載の発現ベクターを導入して得られる形質転換体。

【請求項14】 前記宿主が動物細胞である請求項13記載の形質転換体。

【請求項15】 配列番号2又は3によって示される非A非B型肝炎ウイルス抗原のアミノ酸配列の全部又は一部を含む組換え（ポリ）ペプチドの製造方法であって、請求項1～10のいずれか一項に記載のDNA断片を適当な宿主細胞内で発現させ得る複製可能な発現ベクターを構築する工程、

前記発現ベクターを宿主細胞内に導入して形質転換体を得る工程、

前記DNA断片を発現させ得る条件下で前記形質転換体を培養して前記組換え（ポリ）ペプチドを発現させる工程、及び前記組換え（ポリ）ペプチドを回収する工程を

包含する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、非A非B型肝炎ウイルス抗原をコードするDNA断片に関する。さらに具体的には、該ウイルスの構造蛋白質であるエンベロープ（ENV、NS1）抗原及びその非構造蛋白質であるNS2抗原をコードするDNA断片に関する。本発明はまた、これらのDNA断片の発現に関する。

【0002】

【従来の技術】 非A非B型肝炎は伝染性の肝炎であり、その病因体としてウイルスが示唆されている。特に、血液関連型非A非B型肝炎は、B型肝炎のスクリーニング体制が確立された後の輸血後肝炎として医療上の大きな問題点となっている。

【0003】 病原ウイルスの生物学的な性質は、チンパンジーを使用した感染実験によりクロロホルム感受性のRNAウイルスであることなど一部明らかとなっているが、ウイルス自体の同定には至っていない。1989年に、米国カイロン（Chiron）社のM. Houghtonら（特表平2-500880号公報）のグループによって、非A非B型肝炎に強く関連しているウイルス遺伝子の一部がλgt11システムを利用したイムノスクリーニングによりクローニングされC型肝炎ウイルス（HCV）と命名された。ほぼ同時期、本出願人（特願平3-189268号）を含む多くの研究グループ（例えば、N. Katōら、Proc. Jpn. Acad., 65B, 219-223 (1989)）により、HCV遺伝子が数多くクローニングされその塩基配列及びその配列から予測されるアミノ酸配列の解析からHCVはフラビウイルス（日本脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス等）あるいはペスチウイルス（ブタコレラウイルス等）に近縁のウイルスであろうと推定されている（Q-L. Chooら、Science, 244, 359-362 (1989)）。

【0004】 HCVはHIV等の他のRNAウイルスと同様極めて変異を起こし易く、特に外殻蛋白質の変異が顕著である。その理由によつてか、カイロン社が同定したHCV遺伝子と日本人由来のHCV遺伝子との間には、塩基配列及び推定アミノ酸配列レベルで10数%の変異があることが認められている（下遠野邦忠ら、蛋白質核酸酵素, 36 (10), 1679-1691 (1991)）。

【0005】 ジーンウォーキングにより推定されたHCVの遺伝子構造によると、この構造中には、約3000アミノ酸残基から成るポリプロテインの読み枠が存在し、その5'端に約330ヌクレオチドの非翻訳領域が存在している（N. Katōら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9524-9528 (1990)）。このポリプロテインは、その機能から5'側より構造蛋白質であるコア、エンベロープ、NS1と、非構造蛋白質であるNS2、NS3、NS4、NS5とに分けられる。これらの蛋白質は一本の

ポリプロテインとして合成された後に特異酵素により切断され、それぞれの機能蛋白質が作られていくと考えられている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】現在、コア、NS3、NS4の遺伝子領域を酵母や大腸菌等で発現させて得られた蛋白質がHCV抗体診断薬の抗原として使用されている。これらの領域の発現蛋白質は抗原性が強く、多くの非A非B型肝炎患者の血清中に抗体が認められるため、抗体スクリーニング用の抗原としては最適のものである。

【0007】このようにしてHCV抗体を測定する方法はほぼ確立されてきているが、抗体を測定するだけではたとえ測定結果が陽性であってもその人が現在ウイルスを持っているキャリア（保因者）なのか、以前の感染を反映しているメモリーなのかを判定することはできない。そのため、HCV抗原そのものを測定する系の開発が要望されている。免疫学的にウイルス粒子を検出するためには、ウイルス粒子表面を認識する抗体が必要となる。この目的を達成するためには、HCV粒子を構成している外被蛋白質を免疫して該抗体を作製することになるが、HCVは未だにイン・ビトロ培養系で増殖させることができず、免疫原として使用可能なほど多量に得ることは困難な状況である。また、HCV外被を構成していると考えられているエンベロープ及びNS1領域の遺伝子は変異が激しく、今までに報告されているHCV株間で大きな違いが認められる。従って、全てのHCV粒子を検出するためには、これら株間の変異に対応した抗体が必要であり、抗体を作るための多くの種類の抗原が必要となる。そのためには、HCVの多くの株の構造蛋白質領域をコードする遺伝子が必要であろう。

【0008】本発明者らは、HCV構造蛋白質のように天然には入手しにくい蛋白質を大量に作製するためにDNA組換え技術を用いて、異なるC型肝炎患者からの構造蛋白質コア、エンベロープ、NS1をコードする遺伝子をクローニングし、その遺伝子の発現を行なった。

【0009】本発明の目的は、配列番号2又は3によって示される、非A非B型肝炎ウイルス抗原、特にCORE及び／又はENV及び／又はNS1及び／又はNS2抗原をコードするDNA断片を提供することである。

【0010】本発明の別の目的は、上記DNA断片の発現系、即ち発現ベクター及び形質転換体を提供することである。

【0011】本発明のさらに別の目的は、上記発現系を使用する、配列番号2又は3によって示される非A非B型肝炎ウイルス抗原の全部又は部分的アミノ酸配列を含む組換え（ポリ）ペプチドの製造方法を提供することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、異なるC

型肝炎患者の血漿中から、従来のものと異なり且つ互いに異なる2種類のHCV遺伝子（#4及び#6）をクローニングすることに成功した。

【0013】図1には、HCV（#4）遺伝子の5'側構造を、また図2には、HCV（#6）遺伝子の5'側構造を、それらの制限酵素部位と共に示している。得られたHCV（#4）遺伝子は主として、5'末端に約310塩基対の非翻訳領域（以下、core Iとも称する）、約570塩基対のコア（CORE）領域、約570塩基対のエンベロープ（ENV）領域、約1280塩基対のNS1領域、約720塩基対のNS2領域、及びNS3領域の一部から構成されることが判明した。また、HCV（#6）遺伝子もHCV（#4）遺伝子と類似の遺伝子構造を有していた。

【0014】これら2種類のHCV遺伝子の配列決定に際しては、先ずC型肝炎患者血漿よりRNAを取り出し、これに逆転写酵素を作用させてcDNAを合成し、2種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行なってHCVの増幅DNA断片を得、常法に従って該DNA断片のクローニングを行ない、最後にSanger（Science, 214, 1205~1210 (1981)）のジデオキシ鎖終止法を用いて塩基配列を決定するという手順を採用する。この手法により、5'非翻訳領域（A）、構造遺伝子コア領域（B）、構造遺伝子エンベロープ領域（C）、及び非構造遺伝子NS1/NS2領域（D）の4つの領域のDNA断片を得、それらの各塩基配列を決定した。

【0015】決定された各DNA断片の配列を基に、約3500ヌクレオチドから成るHCV遺伝子（5'非翻訳領域/CORE/ENV/NS1/NS2/NS3）の塩基配列及び推定アミノ酸配列を決定し、HCV（#4）遺伝子に関して決定された配列を配列番号2として、またHCV（#6）遺伝子に関して決定された配列を配列番号3として後記配列表中にそれぞれ示した。

【0016】#4及び#6のHCV遺伝子構造の特徴は以下のとおりである。

【0017】（1）HCV（#4）遺伝子断片
3461ヌクレオチドから成り、翻訳領域はヌクレオチド番号307~3461（1051アミノ酸）であり、このうちCORE領域はヌクレオチド番号307~879（191アミノ酸）、ENV（ENV1とも称する）領域はヌクレオチド番号880~1455（192アミノ酸）、NS1（ENV2とも称する）領域はヌクレオチド番号1456~2736（427アミノ酸）、NS2領域及びNS3領域はヌクレオチド番号2737~3461（241アミノ酸）に対応している。

【0018】（2）HCV（#6）遺伝子断片
3401ヌクレオチドから成り、翻訳領域はヌクレオチド番号307~3401（1031アミノ酸）であり、このうちCORE領域はヌクレオチド番号307~87

9 (191アミノ酸)、ENV (ENV1とも称する) 領域はヌクレオチド番号880~1455 (192アミノ酸)、NS1 (ENV2とも称する) 領域はヌクレオチド番号1456~2736 (427アミノ酸)、NS2領域及びNS3領域はヌクレオチド番号2737~3401 (221アミノ酸) に対応している。

【0019】さらに、HCV (#4) 及びHCV (#

6) 遺伝子断片を、すでに公表されたカイロン社 (WO 90/11089)、岡山ら (J. Virol., 65, 1105-1113 (1991)) 又は下遠野ら (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 9524-9528 (1990)) の配列 (CORE~NS2) とヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の相同性を比較した結果を下記表1に示す。

【0020】

表 1

HCV遺伝子	相 同 性 (%)	
	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
#4 /		
カイロン社	77.8	80.9
岡山ら	89.1	88.0
下遠野ら	90.8	91.5
#6 /		
カイロン社	78.4	82.0
岡山ら	90.4	90.0
下遠野ら	91.2	91.6

表1の相同性比較から、本発明のHCV遺伝子断片は、公表された遺伝子断片との間に、ヌクレオチド配列レベルで約10~25%、アミノ酸配列レベルで約10~20%の違いがあることが分かる。

【0021】従って、本発明は、非A非B型肝炎ウイルス由来の配列番号2又は3によって示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列を含むDNA断片を提供する。なお、該ヌクレオチド配列は、遺伝暗号の縮重に基づく全ての配列を包含するものとする。

【0022】本発明はまた、配列番号2又は3によって示されるENV、NS1及びNS2抗原の全部又は一部をコードするDNA断片を提供する。これらENV、NS1及びNS2の各領域についてはすでに前記したとおりである。

【0023】本発明はさらに、配列番号2又は3によって示される全ヌクレオチドから成るDNA断片を提供する。

【0024】本発明のDNA断片はそれを含む適当な発現ベクターを作製するために、予め任意のプラスミド又はファージに組み込み、大腸菌等の微生物細胞中に移入してクローニングすることにより該DNA断片の多数のコピーが調製される。

【0025】5' 非翻訳領域から非構造蛋白質NS2領域までの各クローン化DNAの継ぎ込みは、決定された塩基配列から予想される制限酵素部位を用いて実施することができる。これによって、5' 非翻訳領域 (A) と構造蛋白質コア領域 (B) の継ぎ込み、非翻訳領域 (A) から構造蛋白質NS1 (C) までの継ぎ込み、5' 非翻訳領域 (A) から非構造蛋白質NS1/NS2 (D) までの継ぎ込みが可能となり、対応するDNA断

片を保有するクローンABC、ABCDを調製することができる。この具体的な手法については、下記実施例3で詳述する。このうち、クローンABCD (CP-4) からの約3.5kb DNA断片はプラスミドに組み込んだ後、大腸菌JM107株に移入し、形質転換体 (E. coli JM107/CP-4) として微工研菌寄第12786号として平成4年2月24日付で寄託されている。

【0026】本発明はまた、上記DNA断片をプロモーターの下流に存在するベクター内のクローニング部位に導入して得られる発現ベクターを提供する。

【0027】ベクターとしては、プラスミド、ファージ等の慣用のベクターの他に、ウイルスが使用され、特にウイルスが好ましく、その中でワクシニアウイルス、バキュロウイルス等が好適である。DNA発現により得られる組換え (ポリ) ペプチドが糖鎖構造をもつようになるか否かによって、使用し得るプロモーター及び宿主の種類が決まる。すなわち、組換え (ポリ) ペプチドが糖鎖構造を含まない場合には、宿主として例えば大腸菌、枯草菌、ファージ等の原核生物を用いることができ、また、プロモーターとして例えばトリプトファン合成酵素オペロン (trp)、ラクトースオペロン (lac)、ラムダファージPL、PR等を用いることができる。一方、組換え (ポリ) ペプチドが糖鎖構造を含む場合には、宿主として例えば酵母、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞等の真核生物が挙げられ、またプロモーターとして酵母等に慣用のプロモーター例えば3-ホスホグリセレートキナーゼ、エノラーゼ等の解糖系酵素に対するプロモーターやアルコールデヒドロゲナーゼに対するプロモーター、哺乳動物細胞で使用され得るウイルスプロモーター例えばポリオマウイルス、アデノウイルス、サルウイルスSV40、ワクシニアウイルス、サイトメガロ

ウイルス等由来のプロモーターが挙げられる。

【0028】ベクターはさらに、形質転換された細胞の表現型選択を可能にするマーカー配列（例えばアンピシリン、テトラサイクリン耐性遺伝子等）、複製開始点、ターミネーター、リボソーム結合部位等を適宜含み得る。

【0029】本発明においては、HCV外被を構成しているエンベロープ及びNS1構造蛋白質が糖鎖を保持しているために、ベクターとしてウイルス好ましくはワクシニアウイルスやバキュロウイルス、また、宿主として動物細胞好ましくは哺乳類細胞（例えばウサギ腎臓細胞RK-13）が使用される。

【0030】本発明のDNA発現用組換えワクシニアウイルスの調製は、本出願人により出願された特願平3-204030号に記載の方法を使用し得る。すなわち、この方法に従って、まず、HCV抗原をコードする遺伝子と、これを発現させ得るウイルスプロモーター（例えばワクシニアウイルス由来のATIプロモーター、p7.5Kプロモーター）と、及びワクシニアウイルスの増殖のために必須でないワクシニアウイルス遺伝子とを含有する組換えプラスミドを作製し、該プラスミドを制限的に線状化し、ワクシニアウイルスが感染している動物細胞にトランスフェクションして相同性組換えを行い、HCV抗原をコードする遺伝子が挿入されている組換えウイルスをスクリーニングし、回収する。ワクシニアウイルスとしては、ワクシニアウイルス・リスター株及びWR株が好適に使用される。バキュロウイルスについても同様に組換え体を調製し得る（実施例3）。

【0031】本発明はさらに、配列番号2又は3によって示される非A非B型肝炎ウイルス抗原のアミノ酸配列の全部又は一部を含む組換え（ポリ）ペプチドの製造方法を提供する。この方法は、本発明のDNA断片を適当な宿主細胞内で発現させ得る複製可能な発現ベクターを構築する工程、該発現ベクターを宿主細胞内に導入して形質転換体を得る工程、DNA断片を発現させ得る条件下で該形質転換体を培養して該組換え（ポリ）ペプチドを発現させる工程、及び該組換え（ポリ）ペプチドを回収する工程を包含する。

【0032】形質転換体の培養条件は、使用する宿主細胞に依存して決定され、増殖可能な培地、培養温度、培養時間等が適宜選択される。また、培養物からの組換え（ポリ）ペプチドの生成は、慣用の技術例えば細胞の超音波破碎、可溶性抽出、硫酸分画、各種クロマトグラフィー等により行うことができる。発現産物は、非A非B型肝炎患者血清との交叉反応性を調べることににより明らかな交叉性を示したことから、非A非B型肝炎の診断及び非A非B型肝炎ウイルスの検出に使用可能である（図3及び図5）。

【0033】

【実施例】以下の実施例により、本発明を更に詳細に説

明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【0034】実施例1

5' 非翻訳領域 (core1) のクローニング

(a) 非A非B型肝炎患者血漿からのcDNAライブラリーの調製

慢性期にある日本人非A非B型肝炎患者の血漿1lを等量の50mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTAで希釈後、細胞破碎物等を3500gで20分間遠心することにより除去する。この上清をさらに4500 rpm (約100000g)、4℃で4時間遠心することによりペレットを得た。このペレットを常法に従い蛋白変性剤である6M Guanidinium thiocyanateを用いて溶解後、セシウムトリフルオロアセテート液の上に重層し、ベックマンSW50ローターで33000 rpm、20℃で18時間遠心してペレットを得た。このペレットを10mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA溶液に溶かし、フェノール：クロロホルム（1：1）混合液で2回の抽出操作の後、上清をとり5M NaClを10分の1量およびエタノールを2.5倍量加えて-20℃に2時間放置した。2時間放置後15000gで20分間遠心し得られたペレットをジエチルピロカーボネート処理水に溶解し、RNA試料とした。

【0035】得られたRNA試料を用いて、Gubler & Hoffmanの方法に従い、市販キット（Amersham社あるいはBRL社）を用いランダムプライマー法によりcDNAを合成した。合成されたcDNAをEcoRIメチラゼで処理した後にEcoRIリンカーあるいはEcoRIアダプターを連結し、λgt11ファージのEcoRI部位にクローニングした。作製したcDNAライブラリーは、平均 $10^6 \sim 10^7$ PFUの組み換え体ファージを含んでいた。

【0036】(b) C型肝炎ウイルス特異的cDNAの単離

C型肝炎ウイルス構造遺伝子として得られたクローンC11-C21（特願平2-413844号）を、ランダムプライマーラベリング法で³²P標識し、プローブとして使用し、ハイブリダイゼーションアッセイにより上記のcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。

【0037】スクリーニングは、大腸菌Y1090株に 5×10^4 PFUの組換え体ファージを37℃、15分間で感染させ、150mmLB寒天プレート（1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1.5%寒天）にまく。37℃で一晩培養し、ブランクが出現したら4℃に1時間放置する。このプレートの寒天にHybond-Nフィルター（アマシャム社）をかぶせて30秒間放置する。次に、変性溶液（0.5M NaOH、1.5M NaCl）で湿らせた濾紙の上にこのフィルターをのせ、2分間放置後、中和溶液（0.5M Tris-HCl pH 7.0、1.5M NaCl）に5分間浸し、更に $2 \times SSC$ （0.3M NaCl、0.03M クエン酸ナトリウム）中で洗浄した後、風乾させる。乾燥したフィルターは、304nmUVを2分間照射し、

UV-クロスリンキングした。

【0038】このフィルターをC11-C21クローンの³²P標識DNAプローブとハイブリダイゼーション液[6×SSC、5×デンハート液(0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン)、0.5%SDS、50μg/ml変性サケ精子DNA]中で、55℃、一晩インキュベートし反応させる。その後、バックグラウンドをおとすため、1×SSC 55℃で10分間ずつ2回洗浄する。このフィルターを-70℃でオートラジオグラフィーを行い、陽性ブランクを検出する。このスクリーニングにより陽性クローンが1つ得られた。

【0039】(c) C型肝炎ウイルス特異的cDNAの配列決定

得られたλgt11クローンのファージを大腸菌に感染させ、大量のファージを回収する。このファージから常法(Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982)に従いDNAを抽出する。このDNAを制限酵素EcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動により約440bの断片を精製した。一方シーケンス用ベクターであるM13ファージのmp19(Messing, J., Method in Enzymology, 101, 20~78)をEcoRIで消化し、線状化した。前記のcDNA断片とベクターDNAを、反応液(66mM Tris-HCl pH 7.6、6.6mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1mM ATP)中でT4リガーゼにより連結し、この反応物を用い、大腸菌JM107株に形質導入した。挿入断片を含むM13ファージをジデオキシ法(Sanger, F. Nioklen, S および Corlson, A. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463~5467, 1977)によって、塩基配列を決定した。決定された塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を配列番号1として示した。

【0040】実施例2

RT-PCRによるHCV(#4)遺伝子の検出

C型肝炎患者の血漿中からHCV遺伝子をクローニングする方法として少量の血清から迅速にクローニングが可能なRT-PCR法を用いた。

【0041】まず、C型肝炎患者血漿50μlに6MのGTC液(6M Guanidinium Thiocyanate、37.5mM クエン酸ナトリウム、0.75%ザルコシル、0.2M メルカプトエタノール)200μlと酵母のtRNA(10mg/ml)1μlを加え攪拌する。さらに3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)20μl、TE飽和フェノール(pH 7.5~8.0)300μl、クロロホルム/イソアミルアルコール(49:1)70μlとすばやく混ぜ、10秒間攪拌した後、氷中に15分静置する。遠心機で15000 rpm、20分間4℃で遠心する。水溶液層をとりイソプロピルアルコールを等量加え、-20℃に1時間以上置く。これを15000 rpm、20分間4℃で遠心し、沈殿させる。沈殿物を4M GTC(6M GT

Cを滅菌水で希釈したもの)100μlで溶解し、等量のイソプロパノールと混合し-20℃に1時間以上静置する。15000 rpm、20分間、4℃で遠心し沈殿物を得る。70%エタノール1mlで洗浄後、室温で風乾し、10μlの滅菌水に溶解しRNAとして使用した。

【0042】cDNA合成はRNA10μlをシリコン処理チューブ(0.6ml)に分注した後、70℃3分間加熱し、氷上で急冷する。次にRNaseインヒビター(宝酒造)1μl(50単位/μl)、dNTP(各20mM)2μl、10×PCRバッファー(0.1M Tris-HCl、pH 8.3、0.5M KCl)2μl、0.1M MgCl₂0.5μl、40mM DTT(ジチオスレイトール)0.5μl、アンチセンスプライマー(オリゴdAプライマー)75 pmole、逆転写酵素(生化学工業)0.2μl(27単位/μl)を加え、滅菌水で計20μlに合わせる。42℃で2時間反応を行い、94℃で5分間加熱し、酵素を失活させた。このcDNAを用いてPCRを行った。PCRはバンドを検出するための感度と特異性を上げるために、2ステップ法を用いた。すなわち、2種のプライマーで1回目のPCRをかける(1st step PCR)。次にそのPCR産物の内側に存在するプライマー2種を用い2回目のPCRをかける(2nd step PCR)方法である。

【0043】5'非翻訳領域(A)、構造遺伝子コア領域(B)、構造遺伝子エンベロープ領域(C)、非構造遺伝子NS1/NS2領域(D)の4つの領域についてプライマーを合成し、PCRに使用した。以下に2ステップ法で使用したPCRプライマーを記述する。

【0044】5'非翻訳領域(A)はcore1(後述の実施例2参照)の塩基配列を参考とした。1st PCRはkk30: 5'-ATCACTCCCCTGTGAGGAAC-3'とkk29: 5'-CCTCCACC AACGATCTGACC-3'を使用し、2nd PCRはkk30とkk31: 5'-CCGGAAACTT AACGTCTTGT-3'を用いた。

【0045】構造遺伝子コア領域(B)はcore1とEN2(特願平2-413844号のクローンC10-E12)の塩基配列を参考とした。1st PCRはkk34: 5'-TGATAGGGTGCTTGCGAGTG-3'とA2: 5'-GCTGCCTCATACACAATACT-3'を用い、2nd PCRはkk36: 5'-AGACCGTGCACCATGAGCAC-3'とA1: 5'-CAGTCGTTCTGTGACATGGTA-3'を使用した。

【0046】構造遺伝子エンベロープ領域(C)はEN2と今回得られた非構造遺伝子NS1/NS2領域を含むクローンDの塩基配列を参考とした。1st PCRではS1: 5'-GTGAACATATGCAACAGGGAAC-3'とA11: 5'-GTCTCATTTCTCTCCCCATT-3'を、2nd PCRはS2: 5'

-GTTGCTCTTTCTCTATCTTC-3' と A10: 5'-AAGCAATACACTGGACCA CA-3' を使用した。

【0047】非構造遺伝子NS1/NS2領域(D)は、EN3(特願平2-413844号のクローンC10-E13)と3NB1(特願平2-339589号のクローンC10-21)を参考とした。1st PCRはkk61: 5'-CAATGGCAGCTGGCACA TCA-3' とkk49: 5'-ACCACCTGAA CCTCCCCCTC-3' を2nd PCRは、kk62: 5'-GAGCGCATGGCCAGCTGCCG -3' とkk50: 5'-TTGTGCGCGGCCG TTAGGCT-3' を使用した。

【0048】PCRの条件はcDNA合成反応液20μlに10×PCRバッファー8μl、1st step プライマー2種(各75pmole)、2mM dNTP 8μlを加え、滅菌水で100μlにする。94℃で10分間加熱し、Ampli Taq(パーキンエルマ・シータス)を1μl(5単位/μl)加え混合した後、ミネラルオイルを2滴重層する。PCR反応は、変性94℃1分間、アニーリング55℃1分間、伸長72℃2分間の条件で30サイクル行った。次に1st PCR反応液10μlに10×PCRバッファー9μl、2nd step プライマー2種(各75pmole)、2mM dNTP 9μlを加え、滅菌水で100μlにする。94℃で10分間加熱し、Ampli Taqを1μl加え、ミネラルオイルを入れて、先の条件で2nd PCRを行う。反応後、反応液10μlをアガロース電気泳動を行い、4つの領域に特異的なDNA断片を検出した。

【0049】PCR産物(HCV#4のDNA断片)のクローニングと塩基配列の決定

HCV(#4)のDNA断片が検出されたPCR反応液(90μl)にKlenowfragment(宝酒造)1μl(2単位/μl)を加え37℃で1時間反応する。低融点アガロース電気泳動により、DNA断片を単離し、TE飽和フェノールで2回抽出操作を行い、DNA断片が溶解している水層をエタノール沈殿した。

【0050】沈殿物に10×キナーゼバッファー(0.5M Tris-HCl pH 7.6、0.1M MgCl₂、50mM DTT、1mMスベルミジン、1mM EDTA pH 8.0) 2μl、10mM ATP 1μl、T4 キナーゼ(宝酒造)1μl(10単位/μl)を加え滅菌水で20μlとし、37℃1時間反応し、5'末端のリン酸化を行う。68℃10分間加熱し、キナーゼを失活させた後pUC119[Vieira, J. & Messing, J., Methods in Enzymology, 153, 3-11(1987)]との連結反応を行う。pUC119(1μg)は制限酵素反応液20μl(10mM Tris-HCl pH 8.0、7mM MgCl₂、20mM KCl、10単位のSmaI酵素(宝酒造))中で37℃1時間反応し、68℃10分間加熱した後、滅菌水80μlを加え、SmaIクローニングベクターとする。リン酸化さ

れたDNA断片10μlとSmaIベクター2μlを10×バッファー(0.66M Tris-HCl pH7.6、50mM MgCl₂、50mM DTT) 2μl、10mM ATT 1μl、T4 リガーゼ(宝酒造)1μl(350単位/μl)、滅菌水4μlを加え、20μlとし、16℃で一晩連結反応を行った。

【0051】この反応液の10μlを用いて大腸菌JM109株を形質転換した。形質転換に用いる感受性大腸菌株は、塩化カルシウム法[Mandel, M. & Higa, A., J. Mol. Biol. 53, 159-162 (1970)]により作られる。

【0052】形質転換大腸菌を2% X-Gal(5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド) 50μlと100mM IPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)が塗布されたLB-Ampプレート[1%トリプシン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1.5%寒天、アンピシリン(25μg/ml)]上で37℃一晩培養した。プレート上に生じたコロニーの中で白色を呈するコロニーを白金耳取り、25μg/mlアンピシリンを含むLB培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl)に移し、一晩37℃で振盪培養した。1.5mlの菌培養液を遠心して集菌し、プラスミドDNAのミニプレパレーションをアルカリ法(Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982)により行った。得られたプラスミドDNA1μgを反応液30μl(100mM Tris-HCl pH 7.5、50mM NaCl、7mM MgCl₂、10単位のEcoRI(宝酒造)およびHind III(宝酒造)酵素)中で37℃1時間消化し、アガロース電気泳動を行って挿入DNA断片の大きさを計算する。4つの領域のDNA断片の大きさは5'非翻訳領域(A)では約400b、構造遺伝子のコア(B)は約600b、エンベロープ(C)は約1kb、非構造遺伝子NS1/NS2(D)では約1.8kbが確認された。

【0053】次に得られた4種類の挿入DNA断片を、シーケンス用ベクターであるM13ファージのmp18およびmp19[Messing, J., Methods in Enzymology, 101, 20-78(1983)]あるいはpUC118およびpUC119[Vieira, J. & Messing, J., Methods in Enzymology, 153, 3-11(1987)]にクローニングし、Sangerらのジデオキシ鎖終止法[Sanger, F. Science, 214, 1205-1210(1981)]を用い塩基配列を決定した。

【0054】クローン化DNAの継ぎ込み

決定された塩基配列から予想される制限酵素部位を用いて5'非翻訳領域(A)から非構造蛋白NS1/NS2領域(D)までを継ぎ込んだクローン(ABCD)を構築した。

【0055】i) 5'非翻訳領域(A)と構造蛋白コア領域(B)の継ぎ込み

クローンAとクローンBの重複する領域に存在するAa.tII部位を利用する。クローンAの1μgDNAを、反応液30μl[10mM Tris-HCl pH 7.5、7mM MgCl₂、6

0mM KCl、10単位のEcoRI（宝酒造）と5単位のAatII（TOYOBO）酵素] 中で、37℃1時間消化し、低融点アガロース電気泳動により約400bのDNA断片を精製する。クローンBの1μg DNAもEcoRIをHindIII（宝酒造）に変えた同様の反応組成で37℃1時間消化し、電気泳動により約600bのDNA断片を精製する。pUC119 1μgを反応液20μl [100mM Tris-HCl pH7.5、50mM NaCl、7mM MgCl₂、10単位のEcoRIとHindIII] 中で37℃1時間反応し、68℃10分間熱処理した後、滅菌水80μlを加え、EcoRI、HindIIIクローニングベクターとする。

【0056】それぞれ精製された断片と、EcoRI-HindIIIベクター2μlを10×バッファー（0.66M Tris-HCl pH 7.6、50mM MgCl₂、50mM DTT）2μl、10mM ATP 1μl、T4 リガーゼ1μl、滅菌水を加えて20μlとし、16℃で一晩連結反応を行った。この反応液10μlで大腸菌JM109株を形質転換した。XGalプレート上で白色を示す形質転換体を25μg/mlアンピシリンを含むLB培地で一晩37℃で振盪培養した。常法に従いミニプレペレーションを行い得られたプラスミドDNAをEcoRIとHindIIIで二重消化し、挿入DNA断片が約1kbの組換えプラスミド（クローンAB）を得た。

【0057】ii) 非翻訳領域（A）から構造蛋白質エンペロプ領域（C）の継ぎ込み
クローンABとクローンCの重複領域に存在するFspI部位を利用する。

【0058】クローンAB 1μgを反応液20μl [50mM 酢酸カリウム、20mM Tris-acetate pH 7.9、10mM 酢酸マグネシウム、5単位のFspI（NEB）酵素] で37℃1時間反応後、10×EcoRIバッファー（1M Tris-HCl pH 7.5、500mM NaCl、70mM MgCl₂）を2μl添加し、EcoRI酵素1μlを加えさらに37℃で1時間反応する。低融点アガロース電気泳動で約1kbのDNA断片を精製する。クローンCも同様にFspI消化後、EcoRIの代りにHindIIIを使用して消化反応を行い、約900bのDNA断片を精製する。それぞれの断片と、EcoRI-HindIIIベクター2μlを用い上述の連結反応を行い、JM109株を形質転換した。形質転換体を培養し、プラスミドDNAを精製し、EcoRIとHindIIIで消化反応した後、電気泳動で1.9kb断片を含むクローンABC組換えプラスミドを得た。

【0059】iii) 非翻訳領域（A）から構造蛋白質NS1の継ぎ込み
クローンABCとクローンDの重なり合う領域の中でStuI部位を利用し、クローンDの内部にあるSacI部位と併用する。

【0060】クローンABC 1μgは、EcoRIとStuI（宝酒造）を用い1×EcoRIバッファー中で消化反応し、電気泳動により約1.8kb DNA断片を

精製する。一方、クローンD 1μgは、StuIとSacI（宝酒造）を1×EcoRIバッファー中で同様に反応し、約500bのDNA断片を精製する。pUC119 1μgも1×EcoRIバッファー中でEcoRIとSacIを37℃1時間反応した後、68℃10分間熱処理し、滅菌水80μlを加えEcoRI-SacIクローニングベクターとする。精製断片とクローニングベクターを上述の方法で連結反応を行い形質転換体からプラスミドDNAを調製する。EcoRIとHindIIIで消化反応を行い、約2.3kbの挿入DNAが検出されるクローンを得た。

【0061】iv) 5' 非翻訳領域（A）から非構造蛋白質NS1/NS2（D）までの継ぎ込み

iii) で得られたクローンをSacIとHindIIIで二重消化し、大きい方のDNA断片を精製する。クローンDをSacIとHindIIIで二重消化し、約1.2kbのDNA断片を精製する。それぞれの精製された断片を上述の連結反応を行い、JM109株に形質転換する。形質転換体を培養し、常法によりプラスミドDNAを調製し、EcoRIとHindIIIを用いて二重消化した後、約3.5kbのDNA断片を生じるクローンABCD（CP-4）を得た。

【0062】このプラスミドは大腸菌JM107株に移入され、形質転換体として微工研菌寄第12786号として平成4年2月24日付で寄託されている。

【0063】ワクシニアウイルス用の組換えプラスミドの構築

HCV（#4）のNS1領域の遺伝子をワクシニアウイルスのヘマグルチニン（HA）遺伝子内に組み込むために用いる組換えプラスミドを以下の方法で作製した。

【0064】得られたクローンCP-4のDNAを利用し、プライマー5'-AGCTGCAGATGATCC CACAAGCC-3'と5'-CTATTACATGGCGTATGCTCG-3'を用いて、上述の条件でPCRを行いNS1領域の遺伝子約1.4kbのDNA断片を増幅する。高温濃度緩衝液（50mM Tris-HCl pH7.9、10mM MgCl₂、100mM NaCl）中でPstIにて消化し、アガロース電気泳動により単離し1.4kbのDNA断片を精製した。クローニングベクターpUC119を反応液20μl（10mM Tris-HCl pH 7.5、10mM MgCl₂、20mM KCl）中でSmaI消化し、1M KClを2μlとPstIを加えてさらに二重消化する。電気泳動を行い、3.1kbのベクター断片を精製した。両方のDNA断片を連結する反応を行い、pUC-NS1を得た。

【0065】pUC-NS1を、反応液20μl（17.5mM Tris-HCl pH 7.5、17.5mM MgCl₂、50mM NaCl）中でHindIII消化し、68℃で10分間熱処理し、酵素を不活化後、滅菌水28μlと1mM dNTP（各1mM dGTP、dATP、dTTP、dCTP）1

μ lとKlenow断片酵素を反応させ、末端を平滑にした。68°C 10分間の熱処理の後、1M Tris-HCl (pH 7.5) を5 μ lと、EcoRIをそれぞれ加え37°Cで消化反応を行った。アガロース電気泳動により1.4 kbのDNA断片を精製した。また組換え用プラスミドpSF4 (S. Funahashiら、J. Virology, 65(10), 5584~5588(1991))を反応液(10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 20mM KCl)中でEcoRIとSmaIの二重消化を行い、ベクター断片を精製した。両者をT4リガーゼにより連結し、大腸菌JM107に形質転換した後、形質転換体からアルカリ法によりプラスミドを回収した。制限酵素による分析を行い、NS1領域が挿入されているプラスミドを確認しこれをpSF・NS1と命名した。

【0066】組換えワクシニアウイルスの作製

(a) トランスフェクションに用いるDNAの調製
DIAGENプラスミドキット(DIAGEN社製)を用いて、200mlの培養液で培養した大腸菌から150 μ gのプラスミドpSF・NS1を抽出した。このプラスミドをCsCl密度勾配遠心法により精製した。すなわち、プラスミドを $\rho=1.47$ g/mlのCsCl液(EtBr含有)に溶解し、クイックシールチューブ(ベックマン社製、ウルトラクリアー、13×51mm)に充填したものを、10°C、55,000 rpmで15時間遠心した。(VT1 65.2 ローター、ベックマン超遠心機)。遠心後、closed circular プラスミドDNAのバンドを回収し、イソプロパノール抽出を3回行ないEtBrを除去した。続いて、エタノール沈殿により、精製プラスミドを得た。

【0067】中塩濃度緩衝液中で上記の精製したpSF・NS1をHind IIIにより開裂した。この線状化した組換えベクターをトランスフェクション用に25 μ g用意した。

【0068】(b) トランスフェクション
遺伝子の導入はPerkusらのエレクトロポレーション法[Marion E. Perkus, Keith Limbach 及び Enzo Paolotti, J. Virol., 63, 3829-3836 (1988)]に準じて行った。すなわち、175 cm²のカルチャーボトルに単層培養したウサギ腎臓由来細胞株RK13細胞にワクシニアウイルス・リスター株をm.o.i. 5で感染させ、37°C、5% CO₂ 下で1時間吸着させた後、トリプシンを用いて感染細胞を回収した。回収した細胞をHeBSバッファー(pH 7.05)で2回洗浄し、(a)でトランスフェクション用に調製したDNA 25 μ gと共に0.8 mlのHeBSバッファーに懸濁した。パルサーキューベット(バイオラッド社製)に細胞懸濁液を移し、この状態で10分間、氷上にて冷却した。この後、バイオラッドジーンパルサーで200V (Capacitance, 980 μ F)のパルスを行なった。再度、氷上にて10分間冷却し、細胞を20mlの10% FCS-MEMに懸濁

し、175 cm²のカルチャーボトルで37°C、5% CO₂ 存在下にて培養した。24時間後、この培養物の凍結融解を3回繰り返し、ウイルスを回収した。

【0069】回収したウイルスから組換えウイルスを赤血球吸着試験(HA試験)によって選択した。試験の方法は以下のとおりである。9cmシャーレに単層培養したRK13細胞に600ブランク/シャーレになるようにウイルスを接種し、2日間培養してブランクを形成させた。培養上清を除き、0.5%のニワトリ赤血球を添加した。37°Cで10分間インキュベートした後、ブランクを観察し、赤血球を吸着しないブランク(組換えウイルス候補株)を得た。

【0070】次に、C型肝炎ウイルスのNS1領域の遺伝子をプローブとして、先に得られた組換えウイルス候補株34クローンのうち10クローンのブランクハイブリダイゼーションを行い、候補株から、さらに遺伝子が組込まれた組換えウイルスを選択した。まず、3cmシャーレに単層培養したRK-13細胞に組換えウイルス候補株を20~50ブランク/シャーレになるように接種し、2日間培養してブランクを形成させた。形成したブランクの上にナイロンメンブラン(ハイボンドN、アマシャム社製)をのせてブランクをメンブラン上に移し、0.5N NaOHにより5分間処理してDNAを変性させた後、1M Tris-HCl (pH 7.4)で中和し、さらに1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH 7.4)で処理してDNAをメンブランに吸着させ、メンブランを風乾したのち、305nmの紫外線を5分間照射してDNAをメンブランに固定した。ハイブリダイゼーションバッファーにこのメンブランを浸し、65°Cで1時間インキュベートした。さらに、ランダムプライムラベリング法を用いて32Pで標識したC型肝炎ウイルスNS1領域の遺伝子を加えたハイブリダイゼーションバッファーにメンブランを移し、65°Cで一晩反応させ、プローブDNAと組換えウイルスDNAをハイブリダイズさせた。1×SSC, 0.1% SDS, 65°Cで10分間ずつ2回洗浄し、-70°Cでオートラジオグラフィーを行ない、陽性クローンを検出した。

【0071】この結果、8クローンが陽性であり、それぞれクローンをpSF・NS1/RLV, #1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10と命名した。

【0072】間接蛍光抗体法による発現の確認

単層培養したRK-13細胞を0.05%トリプシン, 0.1mM EDTA溶液で処理し単細胞にしたのちにMEM培養液(5%仔牛血清, 0.22%炭酸水素ナトリウム)に5万個/mlになるように分散する。この細胞溶液にワクシニア親株のリスター株及びpSF・NS1/RLVをm.o.i. = 0.1になるように別々に接種する。ウイルスが接種された細胞を20 μ l/穴で12穴スライドグラスにのせ37°C、5% CO₂ 下で1晩培養する。培養したスライドグラスを蒸留水で1回洗浄し風乾

した後、 -20°C の5%アセトン、50%メタノール混液に15分間漬けて固定化する。固定後風乾し、PBS(一)で50倍に希釈した非A非B型肝炎患者血清を $20\mu\text{l}$ /穴ずつのせて 37°C で40分間反応させる。40分間の反応後PBS(一)で3回洗浄し、250倍にPBS(一)で希釈した抗ヒトIgG・FITC標識(ヤギ)を $20\mu\text{l}$ /穴ずつのせてさらに 37°C で30分間反応させる。反応終了後PBS(一)で3回洗浄し蛍光顕微鏡で観察したところリスター株を感染させた細胞には蛍光が認められなかったがpSF・NS1/RLVを感染させた細胞には強い特異蛍光が認められた(図3)。

【0073】実施例3

バキュロウイルスを用いたHCV(#4)由来NS1遺伝子の発現

(a) 組換えウイルスの作製

ベクターの作製

トランスファーベクターpAcYM1(Matsuura, Yら, J. Gen. Virol., 68:1233~1250, 1987)を反応液(50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 7mM MgCl₂)中でBamHIで完全消化し、等量のフェノール:クロロホルムで抽出後、水溶液層をとり、エタノールを2倍量加えて -80°C で1時間置く。pUC NS1を反応液(100mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 7mM MgCl₂)でPstIとEcoRIで完全消化し、同様にフェノール:クロロホルム抽出後エタノール沈殿した。15000 rpm、10分間、 4°C で遠心し沈殿物を得る。それぞれの沈殿物にT4ポリメラーゼを用いたランティングキット(宝酒造)のマニュアルに従ってDNA末端の平滑化を行った。アガロース電気泳動により、pAcYM1ベクターとNS1遺伝子を精製し、連結反応を 16°C で一晩行った。組み換えプラスミドの中でポリヘドリンプロモーターを同方向へ挿入されたクローンpBac・NS1を得た。

【0074】トランスフェクション

トランスフェクション緩衝液(20mM HEPES, 1mM Na₂HPO₄, 5mM KCl, 140mM NaCl, 10mM グルコース, pH 7.05) $570\mu\text{l}$ およびバキュロウイルスDNA $1\mu\text{g}$ を2.0mlのマイクロチューブに分注し、それにベクターpBac・NS1 $12\mu\text{g}$ を加え、最終的に蒸留水で $950\mu\text{l}$ にする。2.5M CaCl₂ $50\mu\text{l}$ をチューブに軽く攪拌しながら少しずつ滴下し、室温で30分静置すると、DNAの沈殿が生じる。この沈殿をマイクロピペットで軽くほぐし、 1×10^6 個の夜盗蛾由来の細胞(S.f.細胞)へ接種する。室温で1時間静置後、DNA液を捨て、2.0mlのメディウム(10% FCS添加 Grace's medium, GIBCO社)を加え、 27°C で3日間培養すると、感染した細胞の核内にポリヘドリンが顕微鏡下で観察できる。

【0075】組換えウイルスの分離

トランスフェクション後の培養上清から、ブランクアッセイにより組換えウイルスを選択する。通常、トランスフェクションして3日目の上清には、 $10^5 \sim 10^6$ pfu/mlのウイルスが存在するので、デッシュ(35mm)あたり100個のブランクが出るように希釈して接種する。 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ 個の細胞を35mmのデッシュに用意し、適当に希釈したウイルス液を接種する。1時間後、ウイルス液を捨て、重層寒天培地を2ml加える。この寒天培地は、あらかじめ蒸留水で3%に溶かし滅菌した低融点寒天をメディウムで1%に希釈したものである。重層した培地が固まった後、1mlのメディウムをさらに重層する。 27°C で3~4日間培養し、neutral redを加えて染色し、ブランクを判別する。親株は、白色のブランクを形成するが、組換えウイルスは透明なブランクを作る。多角体非産生の組換えウイルスと思われるブランクをさらにブランクアッセイを繰り返して、純化したクローンを得る。

【0076】(b) 組換えウイルスによるNS1の発現
純化したウイルスをS.f.細胞に5 pfu/細胞となるように感染させ 27°C で24時間培養した。 $20\mu\text{Ci}$ の³⁵S-メチオニンを添加して4時間培養を行いC型肝炎患者血清を用いた免疫沈降法で特異抗原蛋白質を沈降させ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)で分析した。その結果、組換えウイルス感染細胞をC型肝炎患者血清で免疫沈降したものだけにgp58の特異的なバンドが認められNS1が発現されていることが確認された(図5)。

【0077】実施例4

HCV(#6)遺伝子のクローニングと配列決定

C型肝炎患者(#6)からの血清を用いて、実施例2で示した方法によりPCRを行い4種類のPCR産物を得る。#4の塩基配列を参考にしてPCR用プライマーを合成した。5' 非翻訳領域(A)では、1st PCRはkk30とkk29-4: 5'-ACTCCACCAACGATCTGACC-3'を使用し、2nd PCRはkk30とkk31-4: 5'-CCGGGAAGCTTGACGTCCTGT-3'を用いた。構造遺伝子コア領域(B)では、1st PCRはkk34とA2を用い、2nd PCRは、kk36-4: 5'-AGACCGGTGCA TCATGAGCAC-3'とA1-4: 5'-CAGTCGTTTGTGACATGGTA-3'を使用した。構造遺伝子エンベロープ領域(C)では1st PCRはS1-4: 5'-GTGAATTACGCAACAGGGAA-3'とA11を、また2nd PCRはS2とA10を使用した。非構造遺伝子NS1、NS2領域(D)では、1st PCRは、kk61-4: 5'-TACGGCAGCTGGCACATCA-3'とkk50を、また2nd PCRはkk62とA12: 5'-TAGGCCGTGATAGGCGCAAG-3'を使用した。PCR終了後、アガロース電気泳動を行い、4つの

領域に特異的なDNA断片を検出した。クローニングベクターであるSma I消化されたpUC119にそれぞれのDNA断片を連結反応によりクローニングし、Sangerらのジデオキシ鎖終止法を用いて塩基配列を決定した。HCV（#6）遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列を配列番号3として示した。

【0078】

【発明の効果】本発明により、非A非B型肝炎ウイルス（HCV）のコア、エンベロープ及びNS1から成る構造蛋白質並びに非構造蛋白質NS2をコードするDNA配列が決定された。特に、エンベロープ及びNS1領域はHCVの外被を構成する糖蛋白質であるため、これを抗原として利用することによって血清中の微量HCVの存在を高い確度で判定することができるだろう。HCV

配列：

```

GAATTCGCGG CCGCGAATCA CTCCTGTG AGGAACTACT GTCTTCACGC AGAAAGCGTC    60
TAGCCATGGC GTTAGTATGA GTGTCGTACA GCCTCCAGGC CCCCCCTCC CGGGAGAGCC    120
ATAGTGGTCT GCGGAACCGG TGAGTACACC GGAATTGCCG GGAAGACTGG GTCCTTTCTT    180
GGATAAACCC ACTCTATGCC CGGCCATTTG GCGGTGCCCC CGCAAGACTG CTAGCCGAGT    240
AGCGTTGGGT TCGGAAGAGC CTGTGGTAC TGCCTGATAG GGTGCTTGGC AGTGCCCCGG    300
GAGGTCTCGT AGACCGTGCA CC ATG AGC ACA GAT CCT AAA CCT CAA AGA AAA    352
                               Met Ser Thr Asp Pro Lys Pro Gln Arg Lys
                               1                               5
ACC AAA AGA AAC ACT AAC CGT CGC CCA CAA GAC GTT AAG TTT CCG GGC    400
Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly
                               10                               15                               20
GGC GGT CAG ATC GTT GGT GGA GGC GGC CGC GAA TTC    436
Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Gly Gly Arg Glu Phe
                               25                               30

```

配列番号：2

配列の長さ：3461

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

を *in vitro* 培養することは極めて困難である現状において、本発明のDNA断片を発現させることにより、HCVの外被蛋白質を効率的に且つ多量に製造できることは、上記のHCV検出のみならず、非A非B型肝炎の診断やHCVワクチンの開発に大いに寄与し得るといえる。

【0079】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：436

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to genomic RNA

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to genomic RNA

フラグメント型：N末端フラグメント

配列：

```

ATCACTCCCC TGTGAGGAAC TACTGTCTTC ACGCAGAAAG CGTCTAGCCA TGGCGTAGT    60
ATGAGTGTGC TGACGCTCC AGGACCCCCC CTCCTGGGAG AGCCATAGTG GTCTGCGGAA    120
CCGGTGAGTA CACCGGAATT GCCAGGACGA CCGGGTCCTT TCTTGATTA ACCCGCTCAA    180
TGCCTGGAGA TTTGGGCGTG CCCCCTGAG ACTGCTAGCC GAGTAGTGT GGGTCGCGAA    240
AGGCCITGTG GTACTGCCTG ATAGGGTGCT TCGAGTGCC CCGGGAGGTC TCGTAGACCG    300
TGCATC ATG AGC ACA AAT CCT AAA CCT CAA AGA AAA ACC AAA CGT AAC    348
                               Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn
                               1                               5                               10
ACC AAC CGC CGC CCA CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGC GGT GGT CAG ATC    396
Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile
                               15                               20                               25                               30
GTT GGT GGA GTT TAC CTG TTG CCG CGC AGG GGC CCC AGG TTG GGT GTG    444
Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val
                               35                               40                               45
CGC GCG ACT AGG AAG ACT TCC GAG CGG TCG CAA CCT CGT GGA AGG CGA    492
Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg

```

	50						55						60						
CAA CCT ATC CCC AAG GCT CGC CGG CCC GAG GGC AGG GCC TGG GCT CAG																			540
Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln																			
	65						70						75						
CCC GGG TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGT AAC GAG GGC CTG GGG TGG GCA																			588
Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala																			
	80						85						90						
GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGC GGC TCC CGG CCT AGT TGG GGC CCC ACG																			636
Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr																			
	95						100						105						110
GAC CCC CGG CGT AGG TCG CGT AAT TTG GGT AAG GTC ATC GAT ACC CTC																			684
Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu																			
	115						120						125						
ACA TGC GGC TTC GCC GAC CTC ATG GGG TAC ATT CCG CTC GTC GGC GCC																			732
Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala																			
	130						135						140						
CCC CTA GGA GGC GTT GCC AGG GCC CTG GCG CAT GGC GTC CGG GTT CTG																			780
Pro Leu Gly Gly Val Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu																			
	145						150						155						
GAA GAC GGC GTG AAT TAC GCA ACA GGG AAT CTG CCC GGT TGC TCT TTC																			828
Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe																			
	160						165						170						
TCT ATC TTC CTC TTG GCT TTG CTG TCC TGT CTG ACC ATC CCA GCT TCC																			876
Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser																			
	175						180						185						190
GCT TAT GAA GTG CGC AAC GTG TCC GGG GTG TAC CAT GTC ACA AAC GAC																			924
Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val Tyr His Val Thr Asn Asp																			
	195						200						205						
TGC TCC AAC TCA AGT ATT GTG TAT GAG GCA GCG GAC GTG ATC ATG CAC																			972
Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Val Ile Met His																			
	210						215						220						
ACC CCC GGG TGC GTG CCC TGC GTT CGG GAG AGC AAT TTC TCC CGC TGC																			1020
Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Ser Asn Phe Ser Arg Cys																			
	225						230						235						
TGG GTA GCG CTC ACT CCC ACG CTC GCG GCC AGA AAC AGC AGC ATC CCC																			1068
Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ser Ser Ile Pro																			
	240						245						250						
ACT ACG ACA ATA CGA CGC CAT GTC GAT TTG CTC GTT GGG GCA GCT GCT																			1116
Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala																			
	255						260						265						270
CTC TGC TCC GCC ATG TAC GTG GGG GAT CTC TGC GGA TCT GTC TTC CTC																			1164
Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu																			
	275						280						285						
GTC TCC CAG CTG TTC ACC TTC TCA CCT CGC CGG TAT GAG ACG GTA CAG																			1212
Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg Tyr Glu Thr Val Gln																			
	290						295						300						
GAC TGC AAC TGC TCA ATC TAT CCC GGC CAC GTG TCA GGT CAC CGC ATG																			1260
Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met																			
	305						310						315						
GCT TGG GAT ATG ATG ATG AAC TGG TCG CCT ACA ACA GCC CTG GTG GTA																			1308

Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val	
320 325 330	
TCG CAG TTA CTC CGG ATC CCA CAA GCC ATC GTG GAC ATG GTG GCA GGG	1356
Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Val Ala Gly	
335 340 345 350	
GCC CAC TGG GGA GTC CTG GCG GGC CTT GCC TAC TAT TCC ATG GTG GGG	1404
Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly	
355 360 365	
AAC TGG GCT AAG GTC TTG ATT GTG ATG CTA CTC TTT GCT GGC GTT GAT	1452
Asn Trp Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp	
370 375 380	
GGG GGT ACC CAC GTG TCG GGG GGG AGC GCG GCC CAA ACC ACC AGC GGG	1500
Gly Gly Thr His Val Ser Gly Gly Ser Ala Ala Gln Thr Thr Ser Gly	
385 390 395	
CTT GCG TCC CTC TTT ACA TCC GGG TCG GCC CAG AAC ATC CAA CTT GTA	1548
Leu Ala Ser Leu Phe Thr Ser Gly Ser Ala Gln Asn Ile Gln Leu Val	
400 405 410	
AAC ACT AAC GGC AGC TGG CAC ATC AAC AGA ACT GCT CTG AAT TGC AAT	1596
Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn	
415 420 425 430	
GAC TCC CTC AAG ACT GGG TTC CTT GCC GCG CTG TTC TAC ACG CGC AAG	1644
Asp Ser Leu Lys Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Thr Arg Lys	
435 440 445	
TTC AAC TCG TCC GGA TGC CCA GAG CGC ATG GCC AGC TGC CGC CCC ATT	1692
Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Ile	
450 455 460	
GAC AAG TTC GCT CAG GGG TGG GGT CCC ATT ACT CAT GTT GAG CCT CAC	1740
Asp Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr His Val Glu Pro His	
465 470 475	
ATT TCA GAC CAG AGG CCT TAT TGC TGG CAC TAC GCG CCT CGG CCG TGC	1788
Ile Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys	
480 485 490	
GGT ATC GTA CCC GCG TCG CAG GTG TGT GGT CCA GTG TAT TGC TTC ACC	1836
Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr	
495 500 505 510	
CCG AGC CCT GTT GTG GTG GGA ACG ACC GAC CGC TTC GGT GTC CCC ACG	1884
Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr	
515 520 525	
TAC AAA TGG GGA GAG AAT GAG ACG GAC GTG CTA CTC CTC AAC AAC ACG	1932
Tyr Lys Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr	
530 535 540	
CGG CCG CCG CAA GGC AAC TGG TTC AGC TGC ACA TGG ATG AAC AGC ACC	1980
Arg Pro Pro Gln Gly Asn Trp Phe Ser Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr	
545 550 555	
GGG TTC ACC AGG ACG TGC GGG GGC CCC CCG TGT AAC ATC GGG GGG ACC	2028
Gly Phe Thr Arg Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Thr	
560 565 570	
GGC AAC GAC ACC TTG ACC TGC CCT ACG GAT TGC TTC CGT AAG CAC CCC	2076
Gly Asn Asp Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro	
575 580 585 590	

GAG GCC ACT TAC GCC AAA TGC GGC TCG GGG CCT TGG TTG ACA CCT AGG	2124
Glu Ala Thr Tyr Ala Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg	
595 600 605	
TGC TTA GTT GAC TAC CCA TAC AGA CTT TGG CAC TGC CCC TGC ACT GTC	2172
Cys Leu Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Cys Pro Cys Thr Val	
610 615 620	
AAT TTT ACC ATC TTC AAG GTC AGG ATG TAC GTG GGG GGT GTG GAG CAC	2220
Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His	
625 630 635	
AGG CTC GAC GCC GCG TGC AAT TGG ACT CGA GGA GAG CGC TGT GAT TTG	2268
Arg Leu Asp Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu	
640 645 650	
GAG GAC AGG GAT AGA TCA GAG CTC AGT CCG CTG CTA CTG TCT ACT ACA	2316
Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr	
655 660 665 670	
GAG TGG CAG ATA CTG CCT TGC TCC TTC ACC ACC CTA CCG GCT CTG TCC	2364
Glu Trp Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser	
675 680 685	
ACC GGG TTG ATC CAC CTC CAT CAG AAC ATC GCG GAC GTG CAA TAC CTG	2412
Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Ala Asp Val Gln Tyr Leu	
690 695 700	
TAC GGT GTA GGG TCA GCG TTC GTC TCC GTC GTA GTC AGA TGG GAG TAC	2460
Tyr Gly Val Gly Ser Ala Phe Val Ser Val Val Val Arg Trp Glu Tyr	
705 710 715	
GTC CTG CTG CTC TTC CTT CTC CTG GCG GAC GCG CAT GTC TGC GCT TGC	2508
Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala His Val Cys Ala Cys	
720 725 730	
CTC TGG ATG ATG CTG CTG ATA GCC CAG GCT GAG GCC GCC TTA GAG AAC	2556
Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn	
735 740 745 750	
CTG GTG ATC CTC AAC GCG GCG TCC GTG GCT GGA GCG CAT GGC ATT CTC	2604
Leu Val Ile Leu Asn Ala Ala Ser Val Ala Gly Ala His Gly Ile Leu	
755 760 765	
TCC TTC CTT GTG TTC TTC TGC GCT GCC TGG TAC ATC AAG GGC AAG CTG	2652
Ser Phe Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Lys Leu	
770 775 780	
GTG CCC GGG GCG GCA TAT GCT TTT TAT GGC GTA TGG CCG CTG CTC CTG	2700
Val Pro Gly Ala Ala Tyr Ala Phe Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu	
785 790 795	
CTC CTG CTG GCG TTA CCA CCA CGA GCA TAC GCC ATG GAC CGG GAG ATG	2748
Leu Leu Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala Met Asp Arg Glu Met	
800 805 810	
GCC GCA TCG TGC GAA GGC GCG GTT TTC ATA GGT CTG GCA CTC TTG ACT	2796
Ala Ala Ser Cys Glu Gly Ala Val Phe Ile Gly Leu Ala Leu Leu Thr	
815 820 825 830	
TTG TCA CCA CAC TAC AAA GTG TTC CTC GCT AAG CTC ATA TGG TGG TTG	2844
Leu Ser Pro His Tyr Lys Val Phe Leu Ala Lys Leu Ile Trp Trp Leu	
835 840 845	
CAA TAT TTT ATC ACC AGG GCC GAG GCG TGC TTG CAA GTG TGG GTT CCC	2892
Gln Tyr Phe Ile Thr Arg Ala Glu Ala Cys Leu Gln Val Trp Val Pro	

850	855	860	
CCT CTC ATC GTT CGG GGG GGC CGC GAT GCC ATC ATC CTC CTC ACA TGC			2940
Pro Leu Ile Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Ile Ile Leu Leu Thr Cys			
865	870	875	
ATG GTC CAC CCA GAG CTA ATT TTT GAA ATC ACC AAA ATC TTG CTC GCC			2988
Met Val His Pro Glu Leu Ile Phe Glu Ile Thr Lys Ile Leu Leu Ala			
880	885	890	
ATA CTC GGT CCG CTC ATG GTG CTC CAG GCT GGC CTA ACT AGA GTG CCG			3036
Ile Leu Gly Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly Leu Thr Arg Val Pro			
895	900	905	910
TAC TTC GTG CGC GCT CAA GGG CTC ATT CGT GTG TGC ATG TTG GTG CCG			3084
Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly Leu Ile Arg Val Cys Met Leu Val Arg			
915	920	925	
AAA GCC GCT GGG GGT CAT TAT GTC CAA ATG GCC CTC GTG AAG CTG GCC			3132
Lys Ala Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Leu Val Lys Leu Ala			
930	935	940	
GCA TTG ACG GGT ACG TAC GTA TAC AAC CAT CTT ACT CCA CTG CGA GAC			3180
Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asn His Leu Thr Pro Leu Arg Asp			
945	950	955	
TGG GCC CAT GCA GGC CTG CGC GAC CTT GTG GTG GCA GTT GAG CCT GTC			3228
Trp Ala His Ala Gly Leu Arg Asp Leu Val Val Ala Val Glu Pro Val			
960	965	970	
ATC TTC TCT GAC ATG GAG ACC AAG ATC ATC ACC TGG GGG GCA GAC ACC			3276
Ile Phe Ser Asp Met Glu Thr Lys Ile Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr			
975	980	985	990
GCA GCG TGC GGG GAC ATC ATC TCG GGT CTA CCC GTC TCC GCC CGA AGG			3324
Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile Ser Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg			
995	1000	1005	
GGG AGG GAG ATA CTT CTG GGA CCT GCC GAC AGC TTT AGG GAG CAG GGG			3372
Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Ser Phe Arg Glu Gln Gly			
1010	1015	1020	
TGG CGA CTC CTT GCG CCT ATC ACG GCC TAT TCC CAA CAG ACG CGG GGC			3420
Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly			
1025	1030	1035	
CTA ATT GGC TGC ATC ATC ACC AGC CTA ACT GTC CGG GAC AA			3461
Leu Ile Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Val Arg Asp			
1040	1045	1050	

配列番号 : 3

配列の長さ : 3401

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA

配列 :

ATCACTCCCC TGTGAGGAAC TACTGTCTTC ACGCAGAAAG CGTCTAGCCA TGGCGTTAGT	60
ATGAGTGTG TGCAGCCTCC AGGACCCCCC CTCCCAGGAG AGCCATAGTG GTCTGCGGAA	120
CCGGTGAGTA CACCGGAATT GCCAGGACGA CCGGGTCCTT TCTTGGATCA ACCCGCTCAA	180
TGCCTGGAGA TTTGGGCGTG CCCCCGCGAG ACTGCTAGCC GAGTAGTGT GGGTCGCGAA	240
AGGCCTTGTG GTACTGCCTG ATAGGGTGCT TGCGAGTGCC CCGGGAGGTC TCGTAGACCG	300
TGCATC ATG AGC ACA AAT CCC AAA CCC CAA AGA AAA ACC AAA CGT AAC	348
Met Ser. Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn	
1 5 10	
ACC AAC CGT CGC CCA CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGT CAG ATC	396

Thr	Asn	Arg	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	
15					20					25					30	
GTT	GGT	GGA	GTT	TAC	CTG	TTG	CCG	CGC	AGG	GGC	CCC	AGG	TTG	GGT	GTG	444
Val	Gly	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	Leu	Gly	Val	
			35					40					45			
CGC	GCG	ACT	AGG	AAG	ACT	TCC	GAG	CGG	TCA	CAA	CCT	CGT	GGA	AGG	CGA	492
Arg	Ala	Thr	Arg	Lys	Thr	Ser	Glu	Arg	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Arg	Arg	
			50					55					60			
CAA	CCT	ATC	CCC	AAG	GCT	CGC	CAG	CCC	GAG	GGC	AGG	GCC	TGG	GCT	CAG	540
Gln	Pro	Ile	Pro	Lys	Ala	Arg	Gln	Pro	Glu	Gly	Arg	Ala	Trp	Ala	Gln	
		65					70					75				
CCC	GGG	TAC	CCT	TGG	CCC	CTC	TAT	GGC	AAC	GAG	GGC	ATG	GGG	TGG	GCA	588
Pro	Gly	Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	Gly	Asn	Glu	Gly	Met	Gly	Trp	Ala	
		80				85						90				
GGA	TGG	CTC	CTG	TCA	CCC	CGC	GGC	TCC	CGG	CCT	AGT	TGG	GGC	CCC	ACG	636
Gly	Trp	Leu	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Ser	Trp	Gly	Pro	Thr	
	95				100					105				110		
GAC	CCC	CGG	CGT	AGG	TCG	CGT	AAT	TTG	GGT	AAG	GTC	ATC	GAT	ACC	CTC	684
Asp	Pro	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Asp	Thr	Leu	
			115					120					125			
ACA	TGC	GGC	TTC	GCC	GAC	CTC	ATG	GGG	TAC	ATT	CCG	CTC	GTC	GGC	GCC	732
Thr	Cys	Gly	Phe	Ala	Asp	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Ala	
			130					135					140			
CCC	CTA	GGG	GGC	GTT	GCC	AGG	GCC	CTG	GCA	CAT	GGT	GTC	CGG	GTT	GTG	780
Pro	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	His	Gly	Val	Arg	Val	Val	
		145						150					155			
GAG	GAC	GGC	GTG	AAC	TAT	GCA	ACA	GGG	AAT	TTG	CCC	GGT	TGC	TCT	TTC	828
Glu	Asp	Gly	Val	Asn	Tyr	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Pro	Gly	Cys	Ser	Phe	
		160						165				170				
TCT	ATC	TTC	CTC	TTG	GCT	CTG	CTG	TCC	TGT	TTG	ACC	ATC	CCA	GCT	TCC	876
Ser	Ile	Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	Ile	Pro	Ala	Ser	
		175						180					185		190	
GCT	TAT	GAG	GTG	CGC	AAC	GTA	TCC	GGG	ATA	TAC	CAT	GTC	ACG	AAC	GAC	924
Ala	Tyr	Glu	Val	Arg	Asn	Val	Ser	Gly	Ile	Tyr	His	Val	Thr	Asn	Asp	
			195					200					205			
TGC	TCC	AAC	TCA	AGT	ATT	GTG	TAT	GAG	GCA	GCG	GAC	ATG	ATC	ATG	CAT	972
Cys	Ser	Asn	Ser	Ser	Ile	Val	Tyr	Glu	Ala	Ala	Asp	Met	Ile	Met	His	
			210					215					220			
ACC	CCC	GGG	TGC	GTG	CCC	TGC	GTT	CGG	GAG	GGC	AAC	TCC	TCC	CGT	TGC	1020
Thr	Pro	Gly	Cys	Val	Pro	Cys	Val	Arg	Glu	Gly	Asn	Ser	Ser	Arg	Cys	
		225						230					235			
TGG	GTG	GCA	CTT	ACT	CCC	ACG	CTA	GCG	GCC	AGG	AAT	GCC	AGC	GTC	CCC	1068
Trp	Val	Ala	Leu	Thr	Pro	Thr	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ala	Ser	Val	Pro	
		240						245					250			
ACT	ACG	GCA	ATA	CGA	CGC	CAT	GTC	GAT	TTG	CTC	GTT	GGG	GCG	GCT	GCT	1116
Thr	Thr	Ala	Ile	Arg	Arg	His	Val	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	
		255						260					265		270	
TTC	TGC	TCC	GCT	ATG	TAT	GTG	GGA	GAT	CTC	TGC	GGA	TCT	GTT	TTC	CTT	1164
Phe	Cys	Ser	Ala	Met	Tyr	Val	Gly	Asp	Leu	Cys	Gly	Ser	Val	Phe	Leu	
			275					280						285		

GTC TCC CAG CTG TTC ACC TTC TCG CCC CGC CGG CAT GAG ACA ATA CAG	1212
Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Ile Gln	
290 295 300	
GAC TGC AAT TGC TCA ATC TAT CCC GGC CAC GTG TCA GGT CAC CGC ATG	1260
Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met	
305 310 315	
GCT TGG GAC ATG ATG ATG AAC TGG TCG CCT ACA ACG GCC CTG GTG GTG	1308
Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val	
320 325 330	
TCG CAG TTA CTC CGG ATC CCA CAA GCT ATC GTG GAC ATG GTG GCG GGG	1356
Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Val Ala Gly	
335 340 345 350	
GCT CAC TGG GGT GTC CTA GCG GGC CTT GCC TAC TAT TCC ATG GTG GGG	1404
Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly	
355 360 365	
AAC TGG GCT AAG GTA TTG ATT GTG ATG CTA CTT TTT GCC GGC GTC GAC	1452
Asn Trp Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp	
370 375 380	
GGG GAG ACC CGT GTG ACA GGG GGG CAG ATA GCC AGA AAT GCC TAC TCG	1500
Gly Glu Thr Arg Val Thr Gly Gly Gln Ile Ala Arg Asn Ala Tyr Ser	
385 390 395	
CTC ACG ACC CTC TTT TCA TCT GGG TCG GCT CAG AAC ATC CAG CTC ATA	1548
Leu Thr Thr Leu Phe Ser Ser Gly Ser Ala Gln Asn Ile Gln Leu Ile	
400 405 410	
AAC ACC AAC GGT AGC TGG CAC ATC AAC AGG ACT GCC CTG AAC TGC AAT	1596
Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn	
415 420 425 430	
GAC TCC CTC AAC ACC GGG TTT CTT GCC GCG CTG TTC TAC ACG CAC AAG	1644
Asp Ser Leu Asn Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Thr His Lys	
435 440 445	
TTC AAC GCG TCC GGA TGT CCA GAG CGC TTG GCC AGC TGC CGC CCC ATT	1692
Phe Asn Ala Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Pro Ile	
450 455 460	
GAC AAG TTC GAT CAG GGG TGG GGT CCC ATC ACT TAT GCT GAG CAG GGC	1740
Asp Lys Phe Asp Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr Ala Glu Gln Gly	
465 470 475	
GGC CAG GAC CAG AGG CCT TAT TGC TGG CAC TAC GCA CCT AAA CCA TGT	1788
Gly Gln Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Lys Pro Cys	
480 485 490	
GGT ATT GTA TCC GCG TCG AAG GTG TGT GGT CCA GTG TAT TGT TTC ACC	1836
Gly Ile Val Ser Ala Ser Lys Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr	
495 500 505 510	
CCA AGC CCA GTT GTA GTG GGG ACG ACC GAT CGG TTC GGT GTC CCT ACG	1884
Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr	
515 520 525	
TAT AGC TGG GGG GAG AAT GAG ACA GAC GTG CTG CTC CTT AAC AAC ACG	1932
Tyr Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr	
530 535 540	
CGG CCG CCG CAA GGC AAC TGG TTC GGC TGT ACG TGG ATG AAC GGC ACT	1980
Arg Pro Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr	

545	550	555	
GGG TTC ACC AAG ACA TGC GGG GGC CCC CCG TGT AAC ATC GGG GGG GGC			2028
Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Gly			
560	565	570	
GGC AAT AAC ACC TTG ACC TGC CCT ACG GAC TGT TTC CGG AAG CAC CCC			2076
Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro			
575	580	585	590
GCG GCC ACT TAC ACA AAA TGT GGT TCG GGA CCT TGG CTG ACA CCC AGG			2124
Ala Ala Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg			
595	600	605	
TGC TTG GTA GAC TAC CCA TAC AGG CTC TGG CAC TAC CCC TGC ACT GCC			2172
Cys Leu Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ala			
610	615	620	
AAC TTT ACC ATC TTC AAG GTT AGG ATG TAT GTA GGG GGC GTG GAG CAC			2220
Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His			
625	630	635	
AGG CTC GAT GCT GCA TGC AAT TGG ACC CGA GGG GAA CGT TGC AAC TTG			2268
Arg Leu Asp Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asn Leu			
640	645	650	
GAG GAT AGG GAT AGA TTG GAG CTC AGC CCG CTA CTG CTG TCT ACA ACA			2316
Glu Asp Arg Asp Arg Leu Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr			
655	660	665	670
GAG TGG CAG GTG CTG CCC TGT TCT TTC ACC ACC CTA CCG GCT CTG TCC			2364
Glu Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser			
675	680	685	
ACT GGT TTA ATT CAT CTC CAT CAG AAC ATC GTG GAC GTG CAA TAC CTG			2412
Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu			
690	695	700	
TAC GGT ATA GGG TCG GCA GTT GTT TCC TTT GCA ATC AAA TGG GAC TAT			2460
Tyr Gly Ile Gly Ser Ala Val Val Ser Phe Ala Ile Lys Trp Asp Tyr			
705	710	715	
ATC GTG ATA CTT TTC CTC CTC CTG GCG GAC GCG GCG GTC TGT GCC TGC			2508
Ile Val Ile Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ala Cys			
720	725	730	
TTG TGG ATG ATG CTG CTG ATA GCC CAG GCC GAG GCC GCC TTA GAA AAC			2556
Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn			
735	740	745	750
CTG GTG GTC CTC AAT GCG GCG TCC GTG GCC GGA GCG CAT GGC ATT CTC			2604
Leu Val Val Leu Asn Ala Ala Ser Val Ala Gly Ala His Gly Ile Leu			
755	760	765	
TCC TTC CTT GTG TTC TTC TGT GCC GCC TGG TAC ATC AAG GGC AAG CTG			2652
Ser Phe Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Lys Leu			
770	775	780	
GTC CCC GGG GCA GCA TAT GCT TTC TAT GGA GTA TGG CCG CTG CTC CTG			2700
Val Pro Gly Ala Ala Tyr Ala Phe Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu			
785	790	795	
CTT CTG CTG GCC TTA CCA CCA CGA GCT TAC GCT ATG GAG CGG GAG ATG			2748
Leu Leu Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala Met Glu Arg Glu Met			
800	805	810	
GCT GCA TCG TGC GGA GGC GCG GTG TTT GTA GGT CTG GTA CTC TTG ACT			2796

Ala	Ala	Ser	Cys	Gly	Gly	Ala	Val	Phe	Val	Gly	Leu	Val	Leu	Leu	Thr	
815					820					825					830	
TTG	TCA	CCA	TAC	TAT	AAA	GAG	TTC	CTC	GCC	AGG	CTC	ATA	TGG	TGG	TTG	2844
Leu	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Lys	Glu	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ile	Trp	Trp	Leu	
				835					840				845			
CAA	TAT	TTT	ATC	ACC	AGA	GCC	GAG	GCG	CAC	CTG	CAA	GTG	TGG	ATC	CCC	2892
Gln	Tyr	Phe	Ile	Thr	Arg	Ala	Glu	Ala	His	Leu	Gln	Val	Trp	Ile	Pro	
			850					855				860				
CCC	CTC	AAC	ATT	CGG	GGG	GGC	CGC	GAT	GCC	ATC	ATC	CTC	CTC	GCG	TGT	2940
Pro	Leu	Asn	Ile	Arg	Gly	Gly	Arg	Asp	Ala	Ile	Ile	Leu	Leu	Ala	Cys	
		865					870					875				
GTA	GTC	CAC	CCA	GAG	CTA	ATC	TTT	GAC	ATC	ACC	AAA	CTC	CTG	CTC	GCC	2988
Val	Val	His	Pro	Glu	Leu	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Lys	Leu	Leu	Leu	Ala	
	880					885						890				
ATA	CTC	GGT	CCG	CTC	ATG	GTG	CTC	CAG	GCT	AGC	ATA	ACT	CAA	GTG	CCG	3036
Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Met	Val	Leu	Gln	Ala	Ser	Ile	Thr	Gln	Val	Pro	
895				900						905				910		
TAC	TTC	GTA	CGC	GCC	CAA	GGG	CTC	ATT	CGT	GCA	TGC	ATG	TTG	GTG	CGG	3084
Tyr	Phe	Val	Arg	Ala	Gln	Gly	Leu	Ile	Arg	Ala	Cys	Met	Leu	Val	Arg	
			915					920				925				
AAG	GTT	GCC	GGG	GGC	CAT	TAT	GTC	CAA	ATG	GCC	TTT	GTG	AAG	CTG	ACC	3132
Lys	Val	Ala	Gly	Gly	His	Tyr	Val	Gln	Met	Ala	Phe	Val	Lys	Leu	Thr	
		930						935				940				
GCA	CTG	ACA	GGT	ACG	TAC	GTT	TAT	GAC	CAT	CTA	ACT	CCA	CTG	CGG	GAC	3180
Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Val	Tyr	Asp	His	Leu	Thr	Pro	Leu	Arg	Asp	
		945					950					955				
TGG	GCC	CAC	CGG	GGC	CTG	CGA	GAC	CTC	GCG	GTG	GCA	GTA	GAG	CCC	GTT	3228
Trp	Ala	His	Ala	Gly	Leu	Arg	Asp	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Glu	Pro	Val	
	960					965						970				
GTC	TTC	TCT	GAC	ATG	GAG	ACC	AAG	GTC	ATC	ACC	TGG	GGG	GCA	GAC	ACC	3276
Val	Phe	Ser	Asp	Met	Glu	Thr	Lys	Val	Ile	Thr	Trp	Gly	Ala	Asp	Thr	
	975					980						985			990	
GCG	GCG	TGT	GGG	GAC	ATT	ATC	TTG	GGT	CTA	CCT	GTC	TCC	GCC	CGA	AGG	3324
Ala	Ala	Cys	Gly	Asp	Ile	Ile	Leu	Gly	Leu	Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Arg	
			995					1000				1005				
GGT	AGG	GAG	ATA	CTT	CTG	GGG	CCG	GCC	GAT	AGT	CTT	GAA	GGG	CAG	GGG	3372
Gly	Arg	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu	Gly	Gln	Gly	
			1010					1015				1020				
TGG	CGG	CTC	CTT	GCG	CCT	ATC	ACG	GCC	TA							3401
Trp	Arg	Leu	Leu	Ala	Pro	Ile	Thr	Ala								
			1025					1030								

【図面の簡単な説明】

【図1】この図は、HCV（#4）5'側遺伝子構造及び該遺伝子クローニングの戦略を示す。

【図2】この図は、HCV（#6）5'側遺伝子構造及び該遺伝子クローニングの戦略を示す。

【図3】この図は、HCV（#4）のNS1遺伝子を含む組換えワクシニアウイルスの発現による組換えNS1

蛋白質の産生を、間接蛍光抗体法で確認した写真である。下の写真はコントロールである。

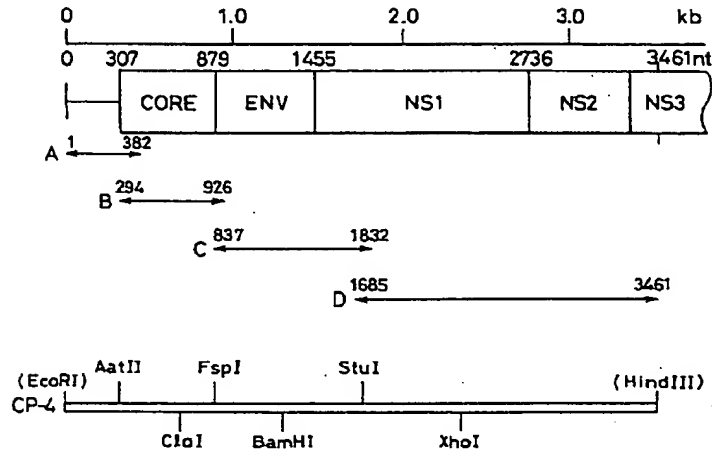
【図4】この図は、HCV（#4）のNS1遺伝子をウイルス遺伝子内に組み込むための組換えプラスミドpBac・NS1及びpSF・NS1の構築法を示す。

【図5】この図は、組換えバキュロウイルスによるHCV（#4）由来組換えNS1蛋白質（gp58）の発現

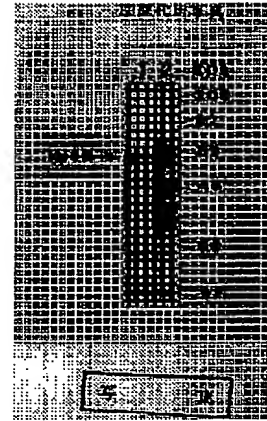
を、C型肝炎患者血清を用いる免疫沈降法／SDS-P
AGEで確認した写真である。レーン2はコントロール

【図1】

図 1

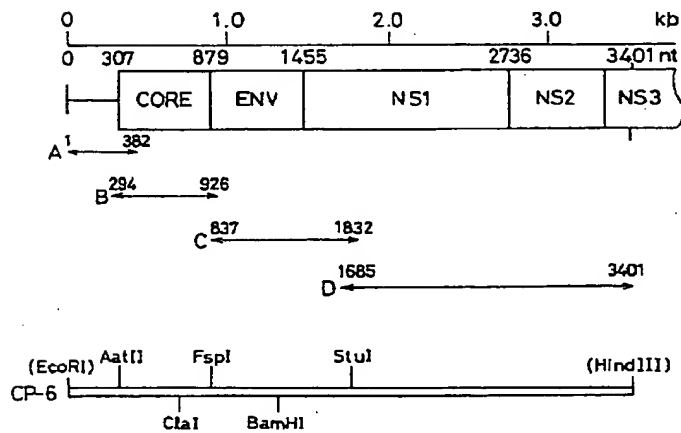


【図5】

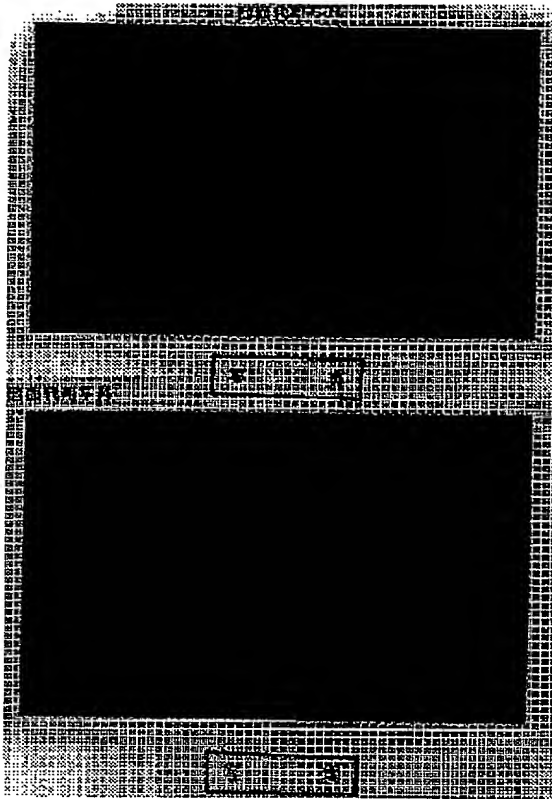


【図2】

図 2

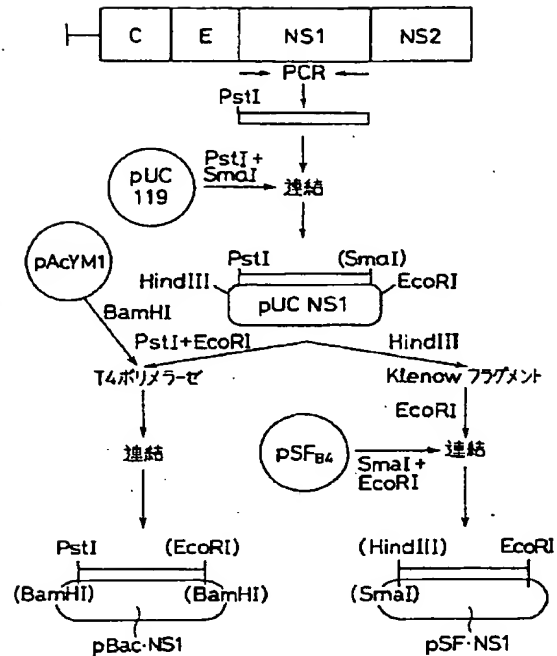


【図3】



【図4】

図4



【手続補正書】

【提出日】平成5年10月7日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図5

【補正方法】変更

【補正内容】

【図5】 この図は、組換えバキュロウイルスによるHCV (#4) 由来組換えNS1蛋白質 (gp58) の発現を、C型肝炎患者血清を用いる免疫沈降法/SDS-PAGEで確認した電気泳動の写真である。レーン2はコントロールである。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 21/02

C 8214-4B

(72) 発明者 小原 恭子

東京都文京区本駒込三丁目18番22号 財団法人 東京都臨床医学総合研究所内

(72) 発明者 浅野 幸康

愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三和化学研究所内

(72) 発明者 三谷 隆彦

愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三和化学研究所内

(72) 発明者 澤井 喜一

愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三和化学研究所内

(72) 発明者 榎 昇

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目 3 番 1
号 東燃株式会社総合研究所内

(72) 発明者 小原 道法

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目 3 番 1
号 東燃株式会社総合研究所内

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-141870

(43)Date of publication of application : 24.05.1994

(51)Int.Cl.

C12N 15/51

C12N 5/10

C12N 15/86

C12P 21/02

(21)Application number : 04-088140

(71)Applicant : TOKYO MET GOV RINSHIYOU
IGAKU SOGO KENKYUSHO
SANWA KAGAKU KENKYUSHO
CO LTD
TONEN CORP

(22)Date of filing : 12.03.1992

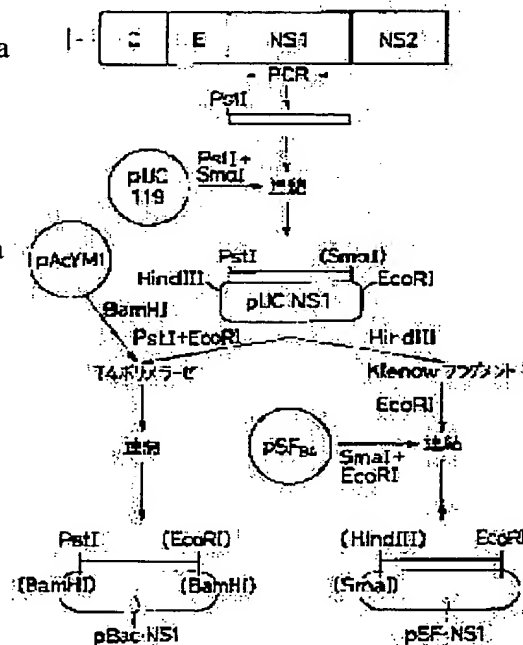
(72)Inventor : NOMOTO AKIO
OBARA KYOKO
ASANO YUKIYASU
MITANI TAKAHIKO
SAWAI KIICHI
MAKI NOBORU
OBARA MICHINORI

(54) DNA FRAGMENT CAPABLE OF CODING NON-A NON-B HEPATITIC VIRAL ANTIGEN

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a DNA fragment capable of coding a non-A non-B hepatic viral antigen and to provide a method for utilizing the DNA fragment.

CONSTITUTION: This DNA fragment is capable of coding a non-A non-B hepatic viral antigen, especially a core envelop (ENV/NS1) and NS2 antigen. An expression system of the DNA fragment and a method for producing a recombinant (poly)peptide by the expression of the expression system are provided.



PRIOR ART

[Description of the Prior Art] Non-A non-B hepatitis is infective hepatitis, and the virus is suggested as the cause-of-a-disease object. Especially blood relation type non-A non-B hepatitis serves as a big trouble on medical treatment as after [transfusion] hepatitis after the screening organization of hepatitis B was established.

[0003] By the infection experiment which used the chimpanzee, the biological property of a pathogenic virus has not resulted in identification of the virus itself, although it is clear that it is the RNA virus of chloroform susceptibility etc. in part. Cloning of a part of virogene strongly related in non-A non-B hepatitis was carried out by the immuno screening using lambda gt11 system in 1989, and it was named hepatitis C virus (HCV) by the group of M.Houghton and others (***** No. 500880 [two to] official report) of U.S. KAIRON (Chiron). Many research groups which contain the period and these people (Japanese Patent Application No. No. 189268 [three to]) mostly (for example, N.Kato and others, Proc.Jpn.Acad., 65B, and 219-223 (1989)), HCV is presumed to be the virus of a close relationship by FURABI viruses (a Japanese encephalitis virus, yellow fever virus, etc.) or PESUCHI viruses (pig cholera virus etc.) from the analysis of the amino acid sequence with which cloning of many HCV genes is carried out, and they are predicted to be from the base sequence and its array (Q-L.Choo et al., Science, 244, and 359-362 (1989)).

[0004] HCV tends [very] to cause variation like other RNA viruses, such as HIV, and especially its variation of coat protein is remarkable. For the reason, it is admitted between the HCV gene which KAIRON identified, and the HCV gene of the Japanese origin that there is about ten% of variation on a base sequence and presumed amino-acid-sequence level (Kunitada Shimotoono et al., a protein nucleic-acid enzyme, 36 (10), and 1679-1691 (1991)).

[0005] According to the gene structure of HCV presumed by the gene walking, in this structure, the reading frame of the polypropylene theine which consists of about 3000 amino acid residues exists, and it is about 330 to the 5' edge. The non-translating field of a nucleotide exists (N. Kato et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87, and 9524-9528 (1990)). This polypropylene theine is divided into the core which is a structural protein, an envelope, NS1, and NS2, NS3, NS4 and NS5 that are a non-structural protein from the function from 5' side. After such protein is compounded as one polypropylene theine, it is cut by the unique enzyme, and it is thought that each functional protein is made.

TECHNICAL PROBLEM

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Now, the protein which was made to discover a core and the gene field of NS3 and NS4 by yeast, *Escherichia coli*, etc., and was obtained is used as an antigen of a HCV antibody diagnostic drug. The manifestation protein of these fields has strong antigenicity, and since an antibody is accepted into many non-A-non-B-hepatitis patients' blood serum, it is the optimal as an antigen for antibody schoolings.

[0007] Thus, although the method of measuring a HCV antibody has been established mostly, even if a measurement result is a positivity, it cannot judge whether it is the memory which is reflecting former infection for whether it is the carrier (carrier) in which the man has the present virus only by measuring an antibody. Therefore, development of the system which measures the HCV antigen itself is demanded. In order to detect a virion immunologically, the antibody which recognizes a virion front face is needed. Although immunity of the housing protein which constitutes the HCV particle will be carried out and this antibody will be produced in order to attain this purpose, HCV cannot still be proliferated by the in vitro cultivation system, and obtaining in a large quantity is a difficult situation, so that it is usable as an immunogen. Moreover, the difference intense [the gene of the envelope considered to constitute the HCV jacket and NS1 field] variation and big at the HCV interval between roots reported until now is accepted. Therefore, in order to detect all HCV particles, the antibody corresponding to the variation of these intervals between roots is required, and many kinds for making an antibody of antigens are needed. For that purpose, probably, the gene which carries out the code of the structural-protein field of many stocks of HCV will be required.

[0008] this invention persons used DNA recombination technology, in order to produce naturally the protein which is hard to come to hand in large quantities like a HCV structural protein, they did cloning of the structural-protein core from a different hepatitis C patient, an envelope, and the gene that carries out the code of NS1, and performed the gene expression

[0009] The purpose of this invention is offering the DNA fragment which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis virus antigen [which is shown by the array number 2 or 3] especially CORE, ENV, NS1, and/or NS2 antigen.

[0010] Another purpose of this invention is offering the manifestation system, i.e., the expression vector, and transformant of the above-mentioned DNA fragment.

[0011] Still more nearly another purpose of this invention is a thing including all or the partial amino acid sequence of non-A-non-B-hepatitis virus antigens shown by the array number 2 which uses the above-mentioned-manifestation system, or 3 for which it rearranges (poly) and the manufacture method of a peptide is offered.

MEANS

[Means for Solving the Problem] This invention persons succeeded in carrying out cloning of two kinds of HCV genes (#4 and #6) which are mutually different out of a different hepatitis C patient's plasma unlike the conventional thing.

[0013] 5' side structure of a HCV (#6) gene is shown for 5' side structure of a HCV (#4) gene in drawing 2 with those restriction enzyme parts again at drawing 1. It mainly made the obtained HCV (#4) gene clear that a part of the non-translating field (it is also hereafter called coreI) of about 310 base pairs, the core (CORE) field of about 570 base pairs, the envelope (ENV) field of about 570 base pairs, NS1 field of about 1280 base pairs, NS2 field of about 720 base pairs, and NS3 field are consisted of by 5' end. Moreover, the HCV (#6) gene also had a HCV (#4) gene and analogous gene structure.

[0014] Sequencing of these two kinds of HCV genes is faced. Take out RNA from hepatitis C patient plasma first, make reverse transcriptase act on this, and cDNA is compounded. Perform polymerase chain reaction (PCR) using two kinds of primers, and the amplification DNA fragment of HCV is obtained. Cloning of this DNA fragment is performed according to a conventional method, and the procedure of using the dideoxy chain stopping method of Sanger (Science, 214, and 1205-1210 (1981)) finally, and determining a base sequence is adopted. By this technique, the DNA fragment of four fields, 5' non-translating field (A), a structural gene core region (B), a structural gene envelope field (C), and non-structural gene NS1/NS2 field (D), was obtained, and each of those base sequences were determined.

[0015] It was shown in the after-mentioned array table, respectively by making the array determined about the HCV (#6) gene by making the array which determined the base sequence and presumed amino acid sequence of a HCV gene (5' non-translating field /, and CORE/ENV/NS1/NS2/NS3) which consist of about 3500 nucleotides, and was determined about the HCV (#4) gene based on the array of each determined DNA fragment into the array number 2 into the array number 3.

[0016] # The feature of the HCV gene structure of 4 and #6 is as follows.

[0017] (1) Consist of HCV (#4) gene fragment 3461 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 307-3461 (1051 amino acid). A CORE field Among these, the nucleotide numbers 307-879 (191 amino acid), An ENV (it is also called ENV1) field The nucleotide numbers 880-1455 (192 amino acid), In the nucleotide numbers 1456-2736 (427 amino acid), NS2 field, and NS3 field, NS1 (it is also called ENV2) field corresponds to the nucleotide numbers 2737-3461 (241 amino acid).

[0018] (2) Consist of HCV (#6) gene fragment 3401 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 307-3401 (1031 amino acid). A CORE field Among these, the nucleotide numbers 307-879 (191 amino acid), An ENV (it is also called ENV1) field The nucleotide numbers 880-1455 (192 amino acid), In the nucleotide numbers 1456-2736 (427 amino acid), NS2 field, and NS3 field, NS1 (it is also called ENV2) field corresponds to the nucleotide numbers 2737-3401 (221 amino acid).

[0019] Furthermore, KAIRON (WO 90/11089) already released in HCV (#4) and the HCV (#6) gene fragment Okayama et al. (J.Virol. and 65 --) The homology of 1105-1113 or (1991) Shimotoono's and others (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87, and 9524-9528 (1990)) array (CORE-NS2) and a nucleotide sequence, and an amino acid sequence The compared result is shown in the following table 1.

[0020]

Table 1 Phase ** Sex (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences # 4/ KAIRON 77.8 80.9 Okayama et al. 89.1 88.0 Shimotoono et al. 90.8 91.5 # 6/ KAIRON 78.4 82.0 Okayama et al. 90.4 90.0 Shimotoono et al. 91.291.6 Homology comparison of Table 1 shows that the HCV gene fragment of this invention has about 10 - 20% of difference on amino-acid-sequence level about 10 to 25% with nucleotide sequence level between the released gene fragments.

[0021] Therefore, this invention offers the DNA fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of all or a part of amino acid sequences shown by the array number 2 of the non-A-non-B-hepatitis virus origin, or 3. In addition, this nucleotide sequence shall include all the arrays based on the degeneracy of a genetic code.

[0022] this invention offers the DNA fragment which carries out the code of all or some of ENV, NS1, and NS2 antigens shown by the array number 2 or 3 again. It is as having already described above about each field of these ENV, NS1, and NS2.

[0023] this invention offers the DNA fragment which consists of all the nucleotides shown by the array number 2 or 3 further.

[0024] In order that the DNA fragment of this invention may produce the suitable expression vector containing it, it includes in arbitrary plasmids or phages beforehand, and much copies of this DNA fragment are prepared by importing into microbial cells, such as Escherichia coli, and carrying out cloning.

[0025] An inherit lump of each cloning DNA from 5' non-translating field to non-structural-protein NS2 field can be carried out using the restriction enzyme part expected from the determined base sequence. Clones AB and ABC and ABCD which hold the DNA fragment which 5' non-translating field (A), and a structural-protein core region (B) inherit, it inherits from a non-translating field (A) to a structural protein NS1 (C), and the inherit lump of from 5' non-translating field (A) to the non-structural proteins NS1/NS2 (D) becomes possible, and corresponds by this can be prepared. This concrete technique is explained in full detail in the following example 3. Among these, about 3.5 kb (s) from Clone ABCD (CP-4) After including a DNA fragment in a plasmid, it is imported into 107 stocks of Escherichia coli jump on minus, and is deposited on February 24, Heisei 4 as Fermentation Research Institute ***** No. 12786 as a transformant (E. coli jump on minus107/CP-4).

[0026] this invention offers the expression vector which introduces the above-mentioned DNA fragment into the cloning part in the vector which exists in a promotor's lower stream of a river again, and is obtained.

[0027] As a vector, the virus other than the vector of common use, such as a plasmid and a phage, is used, especially a virus is desirable, and the vaccinia virus, a baculovirus, etc. are suitable in it. It is decided by whether it rearranges (poly) and a peptide has sugar chain structure to be obtained by DNA manifestation by the kind of the promotor who can use it, and host. namely, -- the case where rearrange (poly) and a peptide does not include sugar chain structure -- as a host -- for example, procaryotes, such as Escherichia coli, a Bacillus subtilis, and a phage, -- it can use -- moreover -- as a promotor -- for example, the tryptophan synthetase operon (trp), a lactose operon (lac), and the lambda phages PL and PR etc. -- it can use On the other hand, when it rearranges (poly) and a peptide includes sugar chain structure, eukaryotes, such as yeast, a plant cell, an insect cell, and an animal cell, are mentioned as a host, and the promotor of the origins, such as the promotor to glycolysis enzymes, such as a promotor of the common use to yeast etc., for example, 3-phosphoglycerate kinase, and enolase, the promotor to an alcohol dehydrogenase, a virus promotor, for example, the polyoma virus, that may be used by the mammalian cell, adenovirus, ape virus simian virus 40, vaccinia virus

[0028] A vector may contain suitably the marker arrays (for example, an ampicillin, a tetracycline resistance gene, etc.) which make possible further phenotypic selection of the cell by which the transformation was carried out, the origin of replication, a terminator, a ribosome binding site, etc.

[0029] since the envelope and NS1 structural protein which constitute the HCV jacket hold the sugar chain in this invention -- as a vector -- a virus -- desirable -- as the vaccinia virus, a baculovirus, and a host -- an animal cell -- a mammals cell (for example, rabbit kidney passage cell RK-13) is used preferably

[0030] Manufacture of the recombination vaccinia virus for a DNA manifestation of this invention can use [Japanese Patent Application No. / for which these people applied / No. 204030 / three to] / the method of a publication. Namely, the gene which carries out the code of the HCV antigen first according to this method, With the virus promotor who may make this discover (for example, the ATI promotor of the vaccinia-virus origin, p7.5K promotor) And the recombination plasmid containing the vaccinia-virus gene which is not indispensable for multiplication of a vaccinia virus is produced. This plasmid is line-ized restrictively, a transfection is carried out to the animal cell with which the vaccinia virus is infected, homology recombination is performed, the recombination virus in which the gene which carries out the code of the HCV antigen is inserted is screened, and it collects. As a vaccinia virus, a vaccinia-virus Lister stock and WR stock are used suitably. A recombinant can be similarly prepared about a baculovirus (example 3).

[0031] this invention is further rearranged including all or a part of amino acid sequences of non-A-non-B-hepatitis viral antigen shown by the array number 2 or 3 (poly), and offers the manufacture method of a peptide. This method includes the process which builds the expression vector which may make the DNA fragment of this invention discover within a suitable host cell, and which can be reproduced, the process which introduces this expression vector in a host cell, and obtains a transformant, the process which this transformant is cultivated [process] under the conditions which may make a DNA fragment discover, and makes this recombination (poly) peptide discover, and the process which collects these recombination (poly) peptides.

[0032] The culture condition of a transformant is determined depending on the host cell to be used, and the culture medium which can be increased, cultivation temperature, cultivation time, etc. are chosen suitably. Moreover, the technology of common use, for example, ultrasonic spallation of a cell, solubilization extraction, ammonium sulfate fractionation, various chromatographies, etc. can perform generation of the recombination (poly) peptide from a culture. Since the manifestation product showed clear decussation nature by investigating cross reaction nature with a non-A-non-B-hepatitis patient blood serum, it is usable to a diagnosis of non-A non-B hepatitis, and detection of a non-A-non-B-hepatitis virus (drawing 3 and drawing 5).

EXAMPLE

[Example] Although the following examples explain this invention still in detail, this invention is not limited to these examples.

[0034] It removes by carrying out the at-long-intervals heart of the cell debris etc. by 3500g after dilution for 20 minutes by 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) of equivalence 1l. of plasma of the Japanese non-A-non-B-hepatitis patient in the manufacture chronic stage of the cDNA library from (Cloning a) non-A-non-B-hepatitis patient plasma of an example 15' a non-translating field (coreI), and 1mM EDTA. The pellet was obtained by carrying out centrifugal [of this supernatant liquid] to a pan at 4500 rpm (about 100000g) and 4 degrees C for 4 hours. According to a conventional method, multistory [of this pellet] is carried out on caesium trifluoroacetate liquid after the dissolution using 6M GUANIJUMU thiocyanate which is a protein modifier, and it is with Beckmann SW50 rotor. Centrifugal was carried out at 33000 rpm and 20 degrees C for 18 hours, and the pellet was obtained. This pellet is melted in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 1mM EDTA solution, after 2 times of extract operation and a supernatant liquid are taken with phenol:chloroform (1:1) mixed liquor, and it is 5M. 1/10 amount and ethanol were left for NaCl at an amount, in addition -20 degrees C 2.5 times for 2 hours. The pellet by which centrifugal might be carried out for 20 minutes by 15000g after 2-hour neglect was dissolved in the diethylpyrocarbonate treated water, and it considered as the RNA sample.

[0035] According to the method of Gubler & Hoffman, cDNA was compounded by the random primer method using the commercial kit (Amersham or BRL) using the obtained RNA sample. After processing compounded cDNA by the EcoRI methylase, the EcoRI linker or the EcoRI adapter was connected, and cloning was carried out to the EcoRI part of lambdgt11 phage. The produced cDNA library contained the recombination object phage of an average of 106 - 107 PFU.

[0036] (b) 32P indicator of the clone C11-C21 (Japanese Patent Application No. No. 413844 [two to]) obtained as a isolation hepatitis-C-virus structural gene of hepatitis-C-virus specific cDNA was carried out by the random primer labeling method, it was used as a probe, and the above-mentioned cDNA library was screened by the hybridization assay.

[0037] Screening infects the recombinant phage of 5x10⁴ PFU with Escherichia coli Y1090 stock in 37 degrees C and 15 minutes, and is wound around a 150mmLB agar plate (1% trypton, 0.5% yeast extract, 0.5%NaCl, 1.5% agar). It cultivates at 37 degrees C overnight, and if a plaque appears, it will be left at 4 degrees C for 1 hour. An Hybond-N filter (Amersham) is put on the agar of this plate, and it is left for 30 seconds. next, the filter paper top made to become wet with a denaturation solution (0.5M NaOH and 1.5M NaCl) -- this filter -- carrying -- after the neglect during 2 minutes, and a neutralization solution (0.5 M Tris-HCl pH 7.0 and 1.5M NaCl) -- for 5 minutes -- dipping -- further -- it is made air-dry after washing in 2xSSC (0.3M NaCl, 0.03M sodium citrate) The dry filter irradiates 304nmUV for 2 minutes, and is UV. - Crosslinking was carried out.

[0038] It incubates 55 degrees C and overnight and this filter is made to react in 32P indicator DNA probe of C11-C21 clone, and hybridization liquid [6xSSC, 5x DIN heart liquid (0.1% bovine serum albumin, 0.1% FIKORU, 0.1% polyvinyl pyrrolidone), 0.5%SDS, and 50microg [/ml] denaturation salmon sperm DNA]. then, in order to drop the background, it washes twice [every / during 10 minutes] at 1xSSC55 degree C Autoradiography is performed for this filter at -70 degrees C, and an electropositive plaque is detected. One electropositive clone was obtained by this screening.

[0039] (c) infect the phage of sequencing profit **** lambdgt11 clone of hepatitis-C-virus specific cDNA with Escherichia coli, and collect a lot of phages According to a conventional method (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982), DNA is extracted from this phage. This DNA was digested by the restriction enzyme EcoRI, and agarose gel electrophoresis refined the fragment of about 440 b. mp19 (Messing, J., Hethod in Enzymology, 101, 20-78) of M13 phage which is a vector for sequence on the other hand was digested and line-ized by EcoRI. An aforementioned cDNA fragment and aforementioned Vector DNA are connected by T4 ligase in reaction mixture (66 mM Tris-HCl pH 7.6, 6.6mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol, 1mMATP), this reactant is used, and it is Escherichia coli jump on minus 107. Transduction was carried out to the stock. The base sequence was determined for M13 phage containing an insert by the dideoxy method (Sanger, F.Nioklen, S and Corlson, A.R.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.74, 5463-5467, 1977). The amino

acid sequence presumed from the base sequence and it which were determined was shown as an array number 1.

[0040] radiographic-PCR method in which cloning is quickly possible was used from the blood serum little as a method of carrying out cloning of the HCV gene out of the plasma of the detection hepatitis C patient of the HCV (#4) gene by example 2 radiographic-PCR.

[0041] First, tRNA(10mg/(ml))1microl of 200micro (6M guanidine thiocyanate, a 37.5mM sodium citrate, 0.75% ZARUKOSHIRU, 0.2M mercaptoethanol) of 6 GTC liquid 1 of M and yeast is added and agitated to 50micro of hepatitis C patient plasma 1. After mixing quickly 3M sodium acetate (pH 5.2) 20microl, TE saturation phenol (pH 7.5-8.0) 300microl, and chloroform / isoamyl alcohol (49:1) 70microl furthermore and agitating for 10 seconds, it puts into ice for 15 minutes. centrifuge 15000 rpm -- it carries out centrifugal at 4 degrees C for 20 minutes An aqueous solution layer is taken and isopropyl alcohol is put on equivalent **** and -20 degrees C for 1 hour or more. this 15000 rpm -- centrifugal is carried out and it is made to precipitate at 4 degrees C for 20 minutes It is 4M about precipitate. It dissolves by GTC(what diluted 6M GTC with sterilized water)100microl, mixes with an equivalent isopropanol, and puts on -20 degrees C gently for 1 hour or more. 15000 For rpm and 20 minutes, carry out centrifugal at 4 degrees C, and obtain precipitate. It was air-dry after washing by ethanol 1ml 70% with the room temperature, dissolved in the sterilized water of 10microl, and was used as RNA.

[0042] After cDNA composition pours RNA10microl distributively in a siliconizing tube (0.6ml), it is heated for 3 minutes 70 degrees C, and is quenched in Hikami. Next, RNase inhibitor (TAKARA SHUZO) 1microl (50 units /mul), dNTP(20 mM(s) each) 2microl and a 10xPCR buffer (M Tris-HCl 0.1 --) pH 8.3, 0.5M KCl2microl, 0.1M MgCl2 0.5microl, 40mM(s) DTT(dithiothreitol) 0.5microl, anti sense primer (oligo dA primer) 75p mole, and 0.2micro (Seikagaku) (27 units /mul) of reverse transcriptase 1 are added, and it doubles with a total of 20microl by the sterilized water. The reaction was performed at 42 degrees C for 2 hours, it heated for 5 minutes at 94 degrees C, and the enzyme was made to deactivate. PCR was performed using this cDNA. PCR used the 2 step method, in order to raise the sensitivity and the singularity for detecting a band. That is, 1st PCR is applied by two sorts of primers (1st step PCR). Next, it is the method to which 2nd PCR is applied using two sorts of primers which exist inside the PCR product (2nd step PCR).

[0043] The primer was compounded about four fields of 5' non-translating field (A), a structural gene core region (B), and structural gene envelope (field C) non-structural gene NS1/NS2 field (D), and it was used for PCR. The PCR primer used for below by the 2 step method is described.

[0044] 5' non-translating field (A) considered the base sequence of coreI (the example 2 below-mentioned reference) as reference. 1st PCR uses kk30:5'-ATCACTCCCCTGTGAGGAAC-3' and kk29:5'-CCTCCACCAACGATCTGACC-3', and is 2nd. PCR used kk30 and kk31:5'-CCGGAAACTTAACGTCTTGT-3'.

[0045] The structural gene core region (B) considered coreI and the base sequence of EN2 (clone C10-E12 of Japanese Patent Application No. No. 413844 [two to]) as reference. 1st PCR uses kk34:5'-TGATAGGGTGCTTGCGAGTG-3' and A2:5'-GCTGCCTCATACACAATACT-3', and is 2nd. PCR used kk36:5'-AGACCGTGCACCATGAGCAC-3' and A1:5'-CAGTCGTTTCGTGACATGGTA-3'.

[0046] The structural gene envelope field (C) considered the base sequence of the clone D including non-structural gene NS1/NS2 field obtained EN2 and this time as reference. 1st At PCR, it is 2nd about S1:5'-GTGAACTATGCAACAGGGAA-3' and A11:5'-GTCTCATTCTCTCCCCATTT-3'. PCR used S2:5'-GTTGCTCTTTCTCTATCTTC-3' and A10:5'-AAGCAATACTGGACCACA-3'.

[0047] Non-structural gene NS1/NS2 field (D) considered EN3 (clone C10-E13 of Japanese Patent Application No. No. 413844 [two to]), and 3NB(s)1 (clone C10-21 of Japanese Patent Application No. No. 339589 [two to]) as reference. 1st PCR is 2nd(s) about kk61:5'-CAATGGCAGCTGGCACATCA-3' and kk49:5'-ACCACCTGAACCTCCCCCTC-3'. PCR used kk62:5'-GAGCGCATGGCCAGCTGCCG-3' and kk50:5'-TTGTCGCGGCCGTTAGGCT-3'.

[0048] The conditions of PCR are 10xPCR buffer 8microl and 1st step in 20micro of cDNA composition reaction mixture 1. Two sorts (75 p mole each) of primers and 2mM dNTP 8microl are added, and it is made 100microl by the sterilized water. it heats for 10 minutes at 94 degrees C --

after 1microl (five units /mul) adding Ampli Taq (PerkinElmer SHITASU) and mixing, it carries out two-drop multistep [of the mineral oil] a PCR reaction -- denaturation 94-degree-C for [1 minute] and annealing 55degree C -- the conditions for 1 minute and for [extension 72 degrees-C] 2 minutes -- 30 cycle ***** Next, 1st They are 10xPCR buffer 9microl and 2nd step in 10micro of PCR reaction mixture 1. Two sorts (75 pmole(s) each) of primers and 2mM dNTP 9microl are added, and it is made 100microl by the sterilized water. It heats for 10 minutes at 94 degrees C, and is Ampli Taq. 1microl In addition, a mineral oil is put in and they are 2nd(s) at previous conditions. PCR is performed. Agarose electrophoresis was performed for 10micro of reaction mixture 1 after the reaction, and the specific DNA fragment was detected to four fields.

[0049] Klenowfragment1 (TAKARA SHUZO) microl (two units /mul) is added to the PCR reaction mixture (90microl) by which the DNA fragment of cloning of a PCR product (DNA fragment of HCV#4) and the determination HCV (#4) of a base sequence was detected, and it reacts at 37 degrees C for 1 hour. By low melting temperature agarose electrophoresis, the DNA fragment was isolated, extract operation was performed twice by TE saturation phenol, and ethanol precipitation of the water layer which the DNA fragment is dissolving was carried out.

[0050] It is 10x kinase buffer (0.5 M Tris-HCl pH 7.6, 0.1M MgCl₂, 50mM DTT, 1mM spermidine, and 1mM EDTA pH 8.0) 2microl, 10mM ATP 1microl, and T4 to precipitate. Kinase (TAKARA SHUZO) 1microl (ten units /mul) is added, it is referred to as 20microl by the sterilized water, 37 degrees C reacts for 1 hour, and 5' end is phosphorized. After heating 68 degrees C for 10 minutes and making a kinase deactivate pUC119 Ligation of [Vieira, J., Messing and J., Methods in Enzymology, 153, and 3-11 (1987)] is performed. After 37 degree C of pUC(s)119 (1microg) reacting for 1 hour and heating them for 10 minutes 68 degrees C in 20micro (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 7mM MgCl₂, 20mM KCl, SmaI enzyme of ten units (TAKARA SHUZO)) of restriction enzyme reaction mixture 1, they add 80micro of sterilized waters 1, and are taken as a SmaI cloning vector. They are 10micro [of DNA fragments] 1 which it phosphorized, and SmaI vector 2microl 10x buffer (0.66 M Tris-HCl pH7.6, 50mM MgCl₂, 50mM DTT) 2microl, 10mM ATT 1microl, and T4 Ligase (TAKARA SHUZO) 1microl (350 units /mul) and 4micro of sterilized waters 1 were added, it was referred to as 20microl, and ligation was performed at 16 degrees C overnight.

[0051] 10microl of this reaction mixture is used and it is Escherichia coli jump on minus 109. The transformation of the stock was carried out. The susceptibility Escherichia coli stock used for a transformation is made by the calcium chloride method [Mandel, M., Higa and A., J.Mol.Biol.53, and 159-162] (1970).

[0052] It is transformation Escherichia coli 2% It cultivated overnight [37 degree-C] on the LB-Amp plate [1% trypsin, 0.5% yeast extract, 0.5%NaCl, 1.5% agar, and an ampicillin (25microg/ (ml))] with which X-Gal(5-BUOMO-4-chloro-3-India Lil-beta-D-galactopyranoside) 50microl and 100mM IPTG (isopropyl-beta-D-thio galactopyranoside) were applied. The colony which presents white in the colony produced on the plate was moved to LB culture medium (1% trypton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) containing 1 loop **** and 25microg [/ml] ampicillin, and the shaking culture was carried out at 37 degrees C overnight. 1. Centrifugal [of the bacillus culture medium of 5 ml] was carried out, it carried out the harvest, and mini-PUREPARESHON of plasmid DNA was performed by the alkaline process (Maniatis et al., Molecular Cloning:ALaboratory Manual, and 1982). The size of an insertion DNA fragment is calculated by digesting obtained 37 degrees C 1micro [of plasmid DNA] g for 1 hour in 30micro (EcoRI and (TAKARA SHUZO) the Hind III (TAKARA SHUZO) enzyme of 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 7mM MgCl₂, and ten units) of reaction mixture 1, and performing agarose electrophoresis. In 5' non-translating field (A), as for the core (B) of about 400b and a structural gene, about 600b was checked, and, as for the size of the DNA fragment of four fields, about 1.8 kb(s) were checked with about 1 kb and the non-structural genes NS1/NS2 (D), as for the envelope (C).

[0053] Next, four kinds of obtained insertion DNA fragments mp18 and mp19 of M13 phage which is a vector for sequence [Messing, J., Methods in Enzymology, 101, and 20-78 (1983)] -- or -- pUC118 and -- pUC119 Cloning is carried out to [Vieira, J., Messing and J., Methods in Enzymology, 153, and 3-11 (1987)]. The base sequence was determined using Sanger's and others method [Sanger, F.Science, 214, and 1205-1210 (1981)] of dideoxy chain stopping.

[0054] The clone (ABCD) which inherited 5' from non-translating field (A) to non-structure protein

NS1/NS2 field (D) using the restriction enzyme part expected from the base sequence by which cloning DNA inherited and a lump decision was made was built.

[0055] i) The AatII part which exists in the field to which 5' non-translating field (A), and a structural-protein core region (B) inherit, and the lump clone A and Clone B overlap is used. 37 degree C of 1microgDNA(s) of Clone A are digested for 1 hour in reaction mixture 30microl [the AatII (TOYOBO) enzyme of 10mM Tris-HCl pH 7.5, 7mMMgCl₂, 60mM KCl, EcoRI (TAKARA SHUZO) of ten units, and five units], and low melting temperature agarose electrophoresis refines the DNA fragment of about 400 b. 37 degree C also of 1microgDNA(s) of Clone B are also digested for 1 hour by the same reaction composition which changed EcoRI into Hind III (TAKARA SHUZO), and they refine the DNA fragment of about 600 b by electrophoresis. 80micro of 20micro [of reaction mixture] l[sterilized waters l is added, and let pUC119 1microg be EcoRI and a HindIII cloning vector, after 37 degrees' C reacting for 1 hour and heat-treating 68 degrees C for 10 minutes in 100 mM Tris-HCl pH7.5, 50mM NaCl, 7mM MgCl₂, and EcoRI of ten units and Hind III.

[0056] They are the fragment refined, respectively and EcoRI-Hind III vector 2microl 10x buffer (0.66 M Tris-HCl pH 7.6, 50mM MgCl₂, 50mM DTT) 2microl, 10mM ATP 1microl, and T4 Ligase 1microl and the sterilized water were added, it was referred to as 20microl, and ligation was performed at 16 degrees C overnight. It is Escherichia coli jump on minus 109 in 10micro of this reaction mixture l. The transformation of the stock was carried out. The shaking culture of the transformant which shows white on a XGal plate was carried out at 37 degrees C overnight by LB culture medium containing 25microl [ml] ampicillin. Double digestion of the plasmid DNA which may have had mini-PUREPARESHON performed according to a conventional method was carried out by EcoRI and Hind III, and the insertion DNA fragment obtained the recombination plasmid (clone AB) of about 1 kb.

[0057] ii) The FspI part which a non-translating field (A) to a structural-protein envelope field (C) inherits, and exists in the duplication field of the lump clone AB and Clone C is used.

[0058] 2microl addition of a 10xEcoRI buffer (1 M Tris-HCl pH 7.5, 500mM NaCl, and 70mM MgCl₂) is done for clone AB1microg after 37-degree-C 1-hour reaction by reaction mixture 20microl [the FspI (NEB) enzyme of 50mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate pH 7.9, 10mM magnesium acetate, and five units], 1micro of EcoRI enzymes l is added, and it reacts at 37 more degrees C for 1 hour. The DNA fragment of about 1 kb is refined by low melting temperature agarose electrophoresis. Clone C performs a digestive reaction instead of EcoRI after FspI digestion similarly using Hind III, and refines the DNA fragment of about 900 b. Above-mentioned ligation is performed with each fragment using EcoRI-HindIII vector 2microl, and it is jump on minus109. The transformation of the stock was carried out. After having cultivated the transformant, refining plasmid DNA and carrying out a digestive reaction by EcoRI and Hind III, the clone ABC recombination plasmid which contains a 1.9kb fragment by electrophoresis was obtained.

[0059] A StuI part is used in the field where a structural protein NS1 inherits from iii a non-translating field (A), and the lump clone ABC and Clones D overlap, and it uses together with the SacI part in the interior of Clone D.

[0060] Clone ABC1microg carries out a digestive reaction in a 1xEcoRI buffer using EcoRI and StuI (TAKARA SHUZO), and is about 1.8 kb(s) by electrophoresis. A DNA fragment is refined. On the other hand, clone D1microg reacts StuI and SacI (TAKARA SHUZO) similarly in a 1xEcoRI buffer, and refines the DNA fragment of about 500 b. In a 1xEcoRI buffer, 37 degrees C pUC119 1microg also heat-treats EcoRI and 68 degree C of SacI(s) for 10 minutes, after reacting for 1 hour, it adds 80micro of sterilized waters l, and makes them an EcoRI-SacI cloning vector. Ligation is performed for a refining fragment and a cloning vector by the above-mentioned method, and plasmid DNA is prepared from a transformant. The digestive reaction was performed by EcoRI and Hind III, and the clone by which the insertion DNA of about 2.3 kb(s) is detected was obtained.

[0061] iv) Inherit lump iii from 5' non-translating field (A) to the non-structural proteins NS1/NS2 (D) They are SacI and HindIII about the obtained clone. Double digestion is carried out and the DNA fragment of the larger one is refined. Double digestion of the clone D is carried out by SacI and Hind III, and the DNA fragment of about 1.2 kb(s) is refined. Above-mentioned ligation is performed for each refined fragment, and it is jump on minus109. A transformation is carried out to a stock. After having cultivated the transformant, preparing plasmid DNA by the conventional

method and carrying out double digestion using EcoRI and Hind III, the clone ABCD (CP-4) which produces the DNA fragment of about 3.5 kb(s) was obtained.

[0062] This plasmid is Escherichia coli jump on minus 107. It imports into a stock and ****s on February 24, Heisei 4 as Fermentation Research Institute ***** No. 12786 as a transformant.

[0063] The recombination plasmid used in order to incorporate the gene of NS1 field of the construction HCV (#4) of the recombination plasmid for vaccinia virus in the hemagglutinin (HA) gene of the vaccinia virus was produced by the following methods.

[0064] DNA of obtained clone CP-4 is used, PCR is performed on condition that a **** using primer 5'-AGCTGCAGATGATCCCAAGCC-3' and 5'-CTATTACATGGCGTATGCTCG-3', and the DNA fragment of gene abbreviation 1.4kb of NS1 field is amplified. It digested in PstI in the elevated-temperature concentration buffer solution (50 mM Tris-HCl pH7.9, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl), and isolated by agarose electrophoresis, and the DNA fragment of 1.4kb(s) was refined. Cloning vector pUC119 SmaI digestion is carried out in 20micro (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 20mM KCl) of reaction mixture I, and it is 1M. 2microl and PstI are added and double digestion of the KCl is carried out further. Electrophoresis was performed and the vector fragment of 3.1kb was refined. The reaction which connects both DNA fragments was performed and pUC-NS1 was obtained.

[0065] Hind III digestion is carried out in 20micro (17.5 mM Tris-HCl pH 7.5, 17.5mM MgCl₂, and 50mM NaCl) of reaction mixture I, pUC-NS1 is heat-treated for 10 minutes at 68 degrees C, and they are after inactivation, 28micro of sterilized waters I, and 1mM about an enzyme. dNTP(one mM each dGTP, dATP, dTTP, dCTP) 1microl and the Klenow fragment enzyme were made to react, and the end was made smooth. After heat treatment for [68 degrees-C] 10 minutes, and 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 5microl and EcoRI were added, respectively and the digestive reaction was performed at 37 degrees C. Agarose electrophoresis refined the DNA fragment of 1.4kb(s). Moreover, double digestion of EcoRI and SmaI was performed for the plasmid pSFB4 (S.Funahashi [et al.], J.Virology, 65(10), 5584-5588 (1991)) for recombination in reaction mixture (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 20mM KCl), and the vector fragment was refined. Both are connected by T4 ligase and it is Escherichia coli jump on minus 107. After carrying out a transformation, plasmids were collected from the transformant by the alkaline process. Analysis by the restriction enzyme was performed, the plasmid in which NS1 field is inserted was checked, and this was named pSF-NS1.

[0066] Plasmid pSF-NS1 of 150microg was extracted from the Escherichia coli cultivated by 200ml culture medium using the manufacture DIAGEN plasmid kit (product made from DIAGEN) of DNA used for the production (a) transfection of the recombination vaccinia virus. This plasmid was refined by CsCl density gradient centrifugation. That is, the plasmid was dissolved in p= 1.47g [/ml] CsCl liquid (EtBr content), and it carried out centrifugal [of that with which the quick seal tube (made in Beckmann, an ultra clearance, 13x51mm) was filled up] by 10 degrees C and 55,000 rpm for 15 hours. (VT1 65.2 rotor, Beckmann ultracentrifuge) . After centrifugal and closed circular The bands of plasmid DNA were collected and deed EtBr was removed for isopropanol extraction 3 times. Then, the refining plasmid was obtained by ethanol precipitation.

[0067] pSF-NS1 which the above refined in the Nakashio concentration buffer solution was cloven by Hind III. 25microg preparation of this line-ized recombination vector was done for transfections.

[0068] (b) Introduction of a transfection gene was performed according to Perkus's and others electroporation method [Marion E.Perkus, Keith Limbach and Enzo Paoletti, J.Virol, 63, 3829-3836 (1988)]. Namely, 175cm² It is a vaccinia-virus Lister stock to rabbit kidney origin cell-strain RK13 cell which carried out the monolayer culture to the culture bottle m.o.i.5 You make it infected and they are 37 degrees C and 5%CO₂. After making it adsorb in the bottom for 1 hour, infected cells were collected using the trypsin. It suspended in the 0.8ml HeBS buffer with DNA25microg which washed the collected cell twice with the HeBS buffer (pH 7.05), and was prepared to transfections by (a). Cell suspension was moved to the pulsar cuvette (Bio-Rad make), and it cooled for 10 minutes in this state in Hikami. Then, the pulse of 200V (Capacitance, 980 micro F) was applied once in the Bio-Rad gene pulsar. Again, it cools for 10 minutes in Hikami, and is a cell 10 20ml% It suspends in FCS-MEM and is 2 175cm². They are 37 degrees C and 5%CO₂ with a culture bottle. It cultivated under existence. Freeze thawing of this culture was repeated 3 times 24 hours after, and viruses were collected.

[0069] It rearranged from the collected virus and the virus was chosen by hemadsorption examination (HA examination). The experimental method is as follows. The virus was inoculated so that it might become 600 plaques / petri dish into RK13 cell which carried out the monolayer culture to 9cm petri dish, and it cultivated for two days, and the plaque was made to form. 0.5% of fowl erythrocyte was added except for the culture supernatant. After incubating for 10 minutes at 37 degrees C, the plaque was observed and the plaque (recombination virus candidate stock) which does not adsorb an erythrocyte was obtained.

[0070] Next, the recombination [which was obtained previously] virus in which it rearranged, plaque hybridization of ten clone was performed among virus candidate stock 34 clones, and the gene was further included from the candidate stock was chosen by using the gene of NS1 field of hepatitis C virus as a probe. First, the virus candidate stock was inoculated so that it might become 20 - 50 plaque / petri dish, and it was cultivated [it rearranged into RK-13 cell which carried out the monolayer culture to 3cm petri dish, and] for two days, and the plaque was made to form. Carry a nylon membrane (the high bond N, product made from Amersham) on the formed plaque, and a plaque is moved on a membrane. 0.5Ns After processing for 5 minutes by NaOH and making DNA denaturalize, 1 M Tris-HCl (pH 7.4) It neutralizes and is a pan. 1.5M NaCl and 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4) Process and DNA is made to stick to a membrane. After air-drying a membrane, 305nm ultraviolet rays were irradiated for 5 minutes, and DNA was fixed to the membrane. This membrane was dipped in the hybridization buffer and it incubated at 65 degrees C for 1 hour. Furthermore, moved the membrane to the hybridization buffer which added the gene of hepatitis-C-virus NS1 field which carried out the indicator by 32P using the random prime labeling method, and it was made to react at 65 degrees C overnight, and rearranged with probe DNA, and virus DNA was made to hybridize. it washed twice [every / during 10 minutes] at 1xSSC, 0.1%SDS, and 65 degrees C, autoradiography was performed at -70 degrees C, and the electropositive clone was detected [0071] Consequently, eight clones are positivities and the clone was named pSF-NS1/RLV, #1, and 2, 3, 5, 6, 7, 9 and 10, respectively.

[0072] They are 0.05% trypsin and 0.1mM about RK-13 cell in which the manifestation by the indirect fluorescent antibody technique carried out the check monolayer culture. After processing with an EDTA solution and making it a single cell, it distributes so that it may become [ml] MEM culture medium (5% calf serum, 0.22% sodium hydrogencarbonate) in 50,000 pieces /. It is the Lister stock and pSF-NS1/RLV of a vaccinia old stock to this cell solution m.o.i.=0.1 It inoculates separately so that it may become. The cell into which the virus was inoculated is put on 12 hole slide glass in 20microl / hole, and they are 37 degrees C and 5%CO₂. One evening is cultivated in the bottom. After distilled water's washing the cultivated slide glass once and being air-dry, it soaks in an acetone and 50% methanol mixture for 15 minutes 5 -20-degree C%, and fixes. Are air-dry after fixation, and the non-A-non-B-hepatitis patient blood serum diluted with PBS (-) 50 times is carried 20microl / hole every, and is made to react for 40 minutes at 37 degrees C. The anti-man IgG-FITC indicator (goat) which washed 3 times after [of a for / 40 minutes / PBS] the reaction (-), and was diluted with PBS (-) 250 times is carried 20microl / hole every, and is made to react for 30 minutes at 37 more degrees C. Although fluorescence was not accepted in the cell with which the Lister stock was infected when it washed 3 times after [PBS] the reaction end (-) and having been observed with the fluorescence microscope, unique fluorescence strong against the cell with which pSF-NS1/RLV was infected was accepted (drawing 3).

[0073] the production transfer vector pAcYM1 (Matsuura, Y et al. --) of the production vector of the HCV (#4) origin NS1 gene-expression (a) recombination virus using example 3 baculovirus Full digestion of J.Gen.Virol., 68:1233-1250, and 1987 is carried out by BamHI in reaction mixture (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 7mM MgCl₂). An equivalent phenol: Take an aqueous solution layer after extraction under chloroform, and place ethanol at quantitas duplex, in addition -80 degrees C for 1 hour. pUC Full digestion of NS1 was carried out by PstI and EcoRI by reaction mixture (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, and 7mM MgCl₂), and after [a phenol:chloroform extraction] ethanol precipitation was carried out similarly. 15000 For rpm and 10 minutes, carry out centrifugal at 4 degrees C, and obtain precipitate. Smoothing of a DNA end was performed according to the manual of the branching kit (TAKARA SHUZO) which used T4 polymerase for each precipitate. By agarose electrophoresis, pAcYM1 vector and NS1 gene were refined and

ligation was performed at 16 degrees C overnight. Clone pBac-NS1 in which the polyhedrin promotor was inserted in this direction in the recombination plasmid was obtained.

[0074] Transfection transfection buffer-solution (20mMHEPES, 1mM Na₂ HPO₄, 5mMKCl, 140mM NaCl, 10mM glucose, pH 7.05) 570microl and baculovirus DNA 1microl are poured distributively in a 2.0ml micro tube, and it is vector pBac-NS1 to it. 12microl is added and, finally it is made 950microl with distilled water. 2.5M If it is dropped little by little and puts at a room temperature for 30 minutes, agitating CaCl₂ 50microl lightly in a tube, precipitation of DNA will arise. This precipitation is lightly unfolded by the micropipette and it is 1x10⁶. The cell (S. f. cell) of the cutworm origin of an individual is inoculated. If DNA liquid is thrown away after 1-hour gentle placement at a room temperature, 2.0ml MEDIUMU (10%FCS addition Grace's medium and GIBCO) is added and it cultivates for three days at 27 degrees C, PORIHE drine compounds can observe under a microscope in the nucleus of the infected cell.

[0075] It rearranges by the plaque assay and a virus is chosen from the culture supernatant after the separation transfection of a recombination virus. Usually, since a transfection is carried out and a 10⁵ - 10⁶ pfu/ml virus exists in the supernatant liquid on the 3rd, it dilutes and inoculates so that the plaque of 100 dish (35mm) hits may come out. One to 1.5x10⁶ The cell of an individual is prepared for a 35mm dish, and the virus liquid diluted suitably is inoculated. Virus liquid is thrown away 1 hour after and 2ml of multistory agar mediums is added. This agar medium dilutes with MEDIUMU the low melting point agar which melted and sterilized to 3% with distilled water beforehand to 1%. After the culture medium which carried out multistory solidifies, it carries out multistory [of MEDIUMU which is 1ml] further. it cultivates for three - four days at 27 degrees C -- neutral red is added and dyed and a plaque is distinguished Although an old stock forms a white plaque, it makes a plaque with a transparent recombination virus. The clone which repeated the plaque assay and purified further the plaque considered to be a non-producing polyhedron recombination virus is obtained.

[0076] (b) The virus in which NS1 by the recombination virus carried out manifestation purification was infected so that it might become an S.f. cell with 5 pfu / cell, and it cultivated at 27 degrees C for 24 hours. Added the 20microcurie 35S-methionine, performed cultivation for 4 hours, unique antigen protein was made to sediment by the immunoprecipitation method using the hepatitis C patient blood serum, and it analyzed by the SDS-polyacrylamide-gel-electrophoresis method (SDS-PAGE). Consequently, it was checked that the specific band of gp58 is accepted only in what carried out immunoprecipitation of the recombination virus infection cell by the hepatitis C patient blood serum, and NS1 is discovered (drawing 5).

[0077] PCR is performed by the method shown in the example 2 using the blood serum from cloning and the sequencing hepatitis C patient (#6) of an example 4HCV (#6) gene, and four kinds of PCR products are acquired. # The base sequence of 4 was made reference and the primer for PCR was compounded. In 5' non-translating field (A), 1stPCR used kk30 and kk29-4:5'-ACTCCACCAACGATCTGACC-3', and 2ndPCR used kk30 and kk31-4:5'-CCGGGAACCTTGACGTCCTGT-3'. In 1stPCR, in the structural gene core region (B), 2ndPCR used kk36-4:5'-AGACCGTGCATCATGAGCAC-3' and aluminum-4:5'-CAGTCGTTTGTGACATGGTA-3' using kk34 and A2. In the structural gene envelope field (C), 1stPCR used S1-4:5'-GTGAATTACGCAACAGGGAA-3' and A11, and 2ndPCR(s) used S2 and A10. In the non-structural gene NS1 and NS2 field (D), 1stPCR used kk61-4:5'-TAACGGCAGCTGGCACATCA-3' and kk50, and 2ndPCR(s) used kk62 and A12:5'TAGGCCGTGATAGGCGCAAG-3'. Agarose electrophoresis was performed after the PCR end and the specific DNA fragment was detected to four fields. pUC119 which is a cloning vector and by which SmaI digestion was carried out Cloning of each DNA fragment was carried out by ligation, and the base sequence was determined using Sanger's and others method of dideoxy chain stopping. The base sequence and presumed amino acid sequence of a HCV (#6) gene were shown as an array number 3.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] This drawing shows the strategy of HCV(#4)5' side gene structure and this gene cloning.

[Drawing 2] This drawing shows the strategy of HCV(#6)5' side gene structure and this gene cloning.

[Drawing 3] This drawing is the photograph which checked production of recombination NS1 protein by the manifestation of the recombination vaccinia virus containing NS1 gene of HCV (#4) by the indirect fluorescent antibody technique. A lower photograph is control.

[Drawing 4] This drawing shows the method of building recombination plasmid pBac-NS1 for incorporating NS1 gene of HCV (#4) in a virogene, and pSF-NS1.

[Drawing 5] This drawing is the photograph which checked the manifestation of HCV (#4) origin recombination NS1 protein (gp58) by the recombination baculovirus by the immunoprecipitation method/SDS-PAGE using a hepatitis C patient blood serum. A lane 2 is control.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The DNA fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of all or a part of amino acid sequences shown by the array number 2 of a non-A-non-B-hepatitis virus antigen.

[Claim 2] The DNA fragment which consists of all the nucleotides shown by the array number 2.

[Claim 3] Amino acid number shown by the array number 2 From 192 DNA fragment which carries out the code of all or some of non-A-non-B-hepatitis virus ENV antigens to 383.

[Claim 4] Amino acid number shown by the array number 2 From 384 DNA fragment which carries out the code of all or some of non-A-non-B-hepatitis virus NS1 antigens to 810.

[Claim 5] Amino acid number shown by the array number 2 DNA fragment which carries out the code of all or some of non-A-non-B-hepatitis virus NS2 antigens from 811 to 1051.

[Claim 6] The DNA fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of all or a part of amino acid sequences shown by the array number 3 of a non-A-non-B-hepatitis virus antigen.

[Claim 7] The DNA fragment which consists of all the nucleotides shown by the array number 3.

[Claim 8] Amino acid number shown by the array number 3 From 192 DNA fragment which carries out the code of all or some of non-A-non-B-hepatitis virus ENV antigens to 383.

[Claim 9] Amino acid number shown by the array number 3 From 384 DNA fragment which carries out the code of all or some of non-A-non-B-hepatitis virus NS1 antigens to 810.

[Claim 10] Amino acid number shown by the array number 3 DNA fragment which carries out the code of all or some of non-A-non-B-hepatitis virus NS2 antigens from 811 to 1031.

[Claim 11] The expression vector which introduces the DNA fragment of a publication into any 1 term of claims 1-10 at the cloning part in the vector which exists in a promotor's lower stream of a river, and is obtained.

[Claim 12] The expression vector according to claim 11 whose aforementioned vector is a virus.

[Claim 13] The transformant which introduces an expression vector according to claim 11 or 12 into a host, and is got.

[Claim 14] The transformant according to claim 13 whose aforementioned host is an animal cell.

[Claim 15] It rearranges including all or a part of amino acid sequences of a non-A-non-B-hepatitis virus antigen shown by the array number 2 or 3 (poly), and is the manufacture method of a peptide. The process which builds the expression vector which may make any 1 term of claims 1-10 discover the DNA fragment of a publication within a suitable host cell, and which can be reproduced, How to include the process which introduces the aforementioned expression vector in a host cell, and obtains a transformant, the process which the aforementioned transformant is cultivated [process] under the conditions which may make the aforementioned DNA fragment discover, and makes the aforementioned recombination (poly) peptide discover, and the process which collects the aforementioned recombination (poly) peptides.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.